



TITLE:

亜鉛フィンガー蛋白質を標的とした人工配位子の分子設計に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

藤田, 美歌子

CITATION:

藤田, 美歌子. 亜鉛フィンガー蛋白質を標的とした人工配位子の分子設計に関する研究. 京都大学, 1996, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

1996-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3110517>

RIGHT:

2
亜鉛フィンガー蛋白質を標的とした人工配位子の

分子設計に関する研究

1996

藤 田 美 歌 子

目次

緒論	1
第一章 イミダゾール配位子によるHIV-EP1のDNA結合の阻害	6
第一節 序論	6
第二節 分子設計	9
第三節 配位子の合成	13
第四節 合成化合物の亜鉛配位能力	17
第五節 HIV-EP1のDNA結合に対する阻害活性	21
第六節 考察	25
第二章メルカプト配位子による効率的な阻害	28
第一節 序論および分子設計	28
第二節 配位子の合成	29
第三節 HIV-EP1のDNA結合に対する阻害活性および考察	32
第三章 転写因子阻害における選択性	37
第一節 序論	37
第二節 HIV-EP1とNF- κ Bの間における選択的な阻害	38
第三節 HIV-EP1とE1Aの間における選択的な阻害	48
第四節 考察	55
第四章 総括	58
実験の部	61
第一章に関する実験	62
第二章に関する実験	69
第三章に関する実験	76
参考文献	79
謝辞	84

緒論

人類は、文明の発達していない昔から病気やけがに直面せざるを得なかった。そしてその苦痛から解放されるために、良い薬が欲しいと願ってきた。それは時代や地域を越えて誰にでも共通する気持ちであることから、人間の基本的な願望であると言えるだろう。

薬は古くには天然資源の中から経験的に見つけられ、精製されることなくそのまま用いられてきた。しかし、17世紀以降に近代科学が確立してからは、薬の有効成分が化学構造を持つ化合物として認識されてきた。また生体反応は非常に複雑であるにもかかわらず、その実体が化学反応式を用いて説明されるようになったため、薬が標的となる生体物質にどのように作用するかについても洞察できるようになってきた。この人が知り得る薬理作用のメカニズムには生体内の複雑さのゆえに未知の部分も多いが、人間はこのメカニズムに基づいてさらに新しい薬物を創ることを目指すようになった。また、生体反応に関する理解を深めるために、薬物を医薬品としてだけでなくバイオリジカルツールとして用いるようにもなった。薬物による生体反応の制御における合理性を追求するメディシナルケミストリーは、近年大きく進展してきている。実際1970年代になって、標的蛋白質の活性部位の立体構造をX線結晶解析により明らかにし、それに基づいて薬物の構造を最適化することで医薬品を創ることもできるようになった。また最近になって、標的蛋白質の構造に関する知見とコンピューターだけを用いた非経験的な方法により、活性を持つような構造を創り出すことも可能となっている¹⁾。

しかしながら、これまでに注目されてきた薬物の標的は主に酵素や受容体であった。一方、近年の分子生物学の著しい発展に伴い、転写因子の構造や機能が明らかになってきた。すなわち生体がスムーズに機能するためには、遺伝子DNAの持つ莫大な情報から、必要な蛋白質が必要な時に必要な場で発現されなくてはならない。蛋白質が発現するための第一段階はDNAからRNAを生成する転写反応であるが、DNAと結合するなどしてその転写反応を巧みに開始させたり調節したりする役割を担う蛋白質が転写因子である。このような転写因子の概念の確立は、薬を創る立場から見ると新しい標的分子の出現にはかならない。

転写因子の機能を阻害することは、その転写因子が調節する遺伝子の発現を選択的に抑えることにつながる(Figure 0-1)。すなわち転写因子の機能を阻害する医薬品があれば、転写因子の

異常だけでなくコード領域に含まれる特定遺伝子の異常に由来する病気など、蛋白質の発現の抑制が治療に必要な病気においても有効であると考えられる。ヒト遺伝子の30億塩基対からなる全塩基配列を決めることを目的としたヒトゲノムプロジェクトの進行により、従来から知られていた遺伝病のほかに多くの疾病が遺伝子に起因することがわかってきた。これまで人類には約6500の遺伝病が知られている。

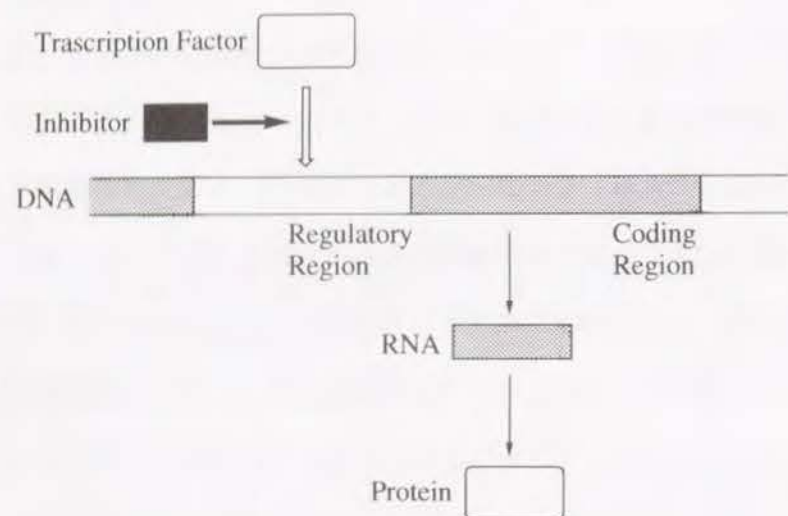


Figure 0-1. Inhibition of the function of transcription factor.

遺伝子の機能を阻害する薬物としては、これまでにアンチセンス分子²⁾やブレオマイシン³⁾、エスベラミシンA₁⁴⁾、ダイナマイシンA⁵⁾などの有機分子のように、DNAやRNAに直接作用するものがよく知られる。アンチセンス分子は塩基配列特異的にDNAやRNAに作用してその機能を阻害することが可能であるが、細胞内では酵素分解を受けやすく不安定である。一方、先に述べたような有機分子は安定ではあるものの、認識するDNA塩基配列の特異性には限界が見られ、特定の遺伝子の発現のみを抑えることは難しい。すなわち、DNAの構造は同一要素の繰り返しであるために有機分子は一様に作用しやすい。従って自然界は転写因子などの巨大な蛋白質に特別な工夫を施し、塩基配列特異的な制御を行なっていると考えられる。そこでその転写因子を、有機分子である薬物の標的として利用することで、塩基配列特異的な遺伝子の制御が可能となると思われる。

近年になって、徐々にではあるが薬物の標的としての転写因子に目が向けられるようになってきた。以前に発見された医薬品の中にも、実は転写因子の機能の阻害に起因して薬理作用を示すことが最近になって示されたものがある。

例えば抗炎症薬として古くから使われてきたサリチル酸やアスピリン (Figure 0-2) がある。すなわち転写因子NF- κ B (後述) はその阻害蛋白質I κ Bと結合して通常は細胞質に存在しているが、転写因子として作用する場合にはI κ Bと解離することで核内に移行してDNAに作用することが知られる。サリチル酸やアスピリンは、このNF- κ B-I κ B複合体からI κ Bが解離しないように働くことで、NF- κ Bの転写因子としての機能を阻害することが示された⁷⁾。これまでにこれらの抗炎症薬はプロスタグランジンの生合成を阻害することにより薬理作用を示すと考えられてきたが、詳細はわかっていなかった。しかしながらこれらの成果により、サリチル酸やアスピリンが炎症に関わる転写因子NF- κ Bを阻害することで抗炎症薬として作用する可能性が示された。

また、放線菌の生産物から近年発見され、最近上市された強力な免疫抑制剤タクロリムス (FK 506, Figure 0-2) も、転写因子の機能阻害に関わる医薬品である⁸⁻¹²⁾。タクロリムスは発見以来、その薬理作用のメカニズムについてSchreiber, Crabtree, O'Keefeらによって興味を持たれ、精力的に研究が展開されてきた。その結果、タクロリムスは転写因子NF-ATの機能を阻害することが明らかになってきた。すなわち、NF-ATもNF- κ Bと似て通常は細胞質に存在しているが、転写因子として作用する場合には酵素カルシニューリンの働きで核内に移行してDNAに作用することがわかっている。タクロリムスは蛋白質FKBPと結合し、その複合体がさらにカルシニューリンと結合するためにカルシニューリンの機能が妨げられ、NF-ATが転写因子として機能しなくなることが示された。それによってNF-ATが発現を支配しているサイトカインであるインターロイキン 2が生産されなくなり、免疫抑制作用を示すと考えられている。

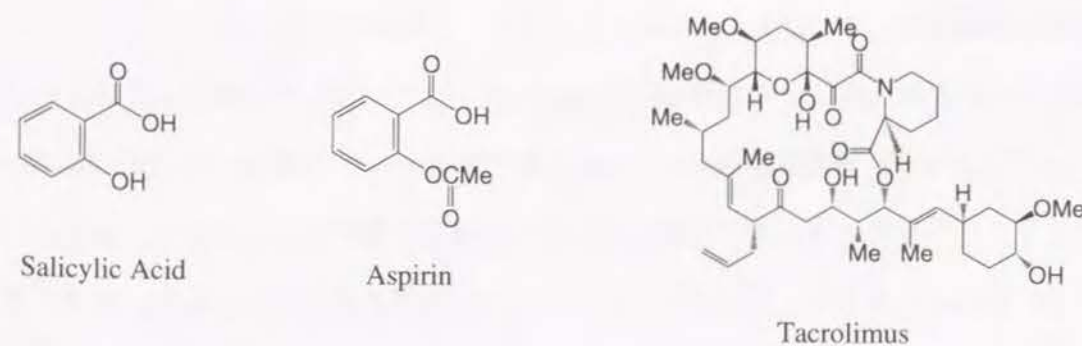
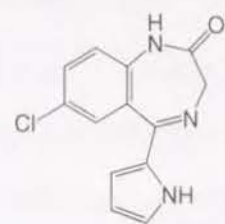
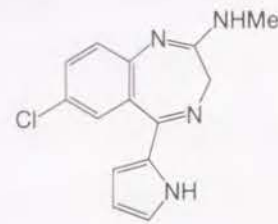


Figure 0-2. Structures of compounds that inhibit the function of NF- κ B and NF-AT.

これらとは異なり、最初から転写因子の機能を阻害する化合物の発見を目指して創薬を行なった例もある。転写因子Tatはエイズウイルスが持ち、エイズウイルス遺伝子の発現に関わることが広く研究されていた。Roche社はTatを阻害すれば有効なエイズ薬になると考え、まず細胞を用いたアッセイ法を確立した¹³⁾。これを用いてスクリーニングを行なった結果、精神安定剤を目指して既に合成されていたRo 5-3335 (Figure 0-3)が、Tatが転写因子として関与する遺伝子発現を阻害することがわかった^{14,15)}。さらに毒性の少ない類縁体Ro 24-7429 (Figure 0-3) が合成され¹⁶⁾、その開発が進められた。しかし残念なことに臨床試験 (phase II) で期待されたほどの臨床効果が見られず、開発が中止となった。



Ro 5-3335



Ro 24-7429

Figure 0-3. Structures of compounds that inhibit the function of Tat.

また先に述べたNF- κ Bは、免疫応答や炎症作用に必須の遺伝子の発現に関わるということが知られている。最近Signal Pharmaceutical社はNF- κ Bの機能を阻害する小分子化合物を発見し、ぜんそくや関節炎の治療薬としての開発を行なっていることを明らかにしている。

Ro 24-7429がどのようにしてTatの機能を阻害しているかについてはわかっていないようであるが、Tatの、それが認識するRNAに対する結合能を阻害するのではないことが示されている¹⁷⁾。またアスピリンやタクロリムスは転写因子の核への移行を阻害するのであり、転写因子に直接作用しているわけではない。転写因子に至るシグナル伝達系を阻害する場合、その下流にある別の生体物質にも影響する可能性があるため、転写因子に直接作用する薬物が阻害剤としては最良であると考えられる。しかしながら、このような薬物はほとんど知られていない。大部分の転写因子は酵素や受容体と異なって基質である有機分子と結合するための部位は持たないこ

とから、転写因子に直接作用する薬物を創ることは困難を伴うであろう。しかし、逆にこれは挑戦的な創薬でもある。(なお転写因子がグルココルチコイドやレチノイドの核内レセプターとしても働くことは知られ、これら有機化合物の類縁体が転写因子の機能を制御する例はある。)

創薬を目指す者にとって、転写因子を標的とした医薬品を合理的に創ることは大きな目標である。しかしながら、そこに至る道は容易ではないだろう。それでもその一歩として、できるだけ新しく合理的な方法によって転写因子に直接作用するような阻害剤を創りたい。このような化合物の創製が本研究の目的である。そのために、人工化合物を分子設計、合成し、その阻害活性を評価した。

第一章

イミダゾール配位子によるHIV-EP1のDNA結合の阻害

第一節 序論

現在、人類が克服したいと最も強く願っている病気はエイズ（後天性免疫不全症候群）であろう。エイズは免疫システムの中樞を破壊し、発症すれば非常に致死率の高い重篤な疾患である。1981年にエイズの患者が最初に見つかった以来、世界各地で患者数は爆発的な増加を続け、その制圧に向けての対策は国際的な問題になっている。しかしながら、決定的な予防法や治療法は未だにない。それでも、世界中の多くの科学者の努力により、エイズの正体は次第に明らかになってきた。初めの突破口は、1983年にMontagnierらがエイズ前駆症状の患者からのレトロウイルスLAV（後にHIV-1と改名された）の分離に成功したことである¹⁸⁾。1985年にはその9193の全塩基配列が決定されて遺伝子地図が作られ、gag、pol、env遺伝子やHIV-1に特有の遺伝子の位置が示された¹⁹⁾。

レトロウイルスに感染した細胞中では、すでに宿主細胞に組みこまれたウイルス（プロウイルス）の遺伝子から蛋白質が発現することにより感染者は潜伏期間を終えて発病に向かうことになる。レトロウイルス遺伝子発現の制御はプロウイルス両末端にあるLTR (long terminal repeat) と呼ばれる300-1300の塩基配列中のプロモーターやエンハンサー上で行なわれることが既に知られていたが、1985年にHIV-1のLTR上のエンハンサーの位置も決定された²¹⁾。その結果、おもしろいことにLTRのエンハンサーには4塩基をはさんで2つのκB配列 (5'-GGGACTTTCC-3', NF-κB認識配列ともいう) が存在していることがわかった (Figure 1-1)。

このκB配列は、免疫応答に必須の多様な遺伝子の発現に関わる、既に発見されていた²²⁾転写因子NF-κB²³⁻²⁵⁾（後述）が特異的に認識することで知られていた塩基配列である。すなわち免疫システムを破壊するこのウイルスは、ウイルス自身が持つκB配列と、人間が本来は免疫関連蛋白質の発現のために持つNF-κBなどの転写因子を利用して遺伝子発現を行なうと考えられる。

実際HeLa細胞抽出液で処理した、LTRを含むDNAのフットプリンティングによっても、このκB配列に転写因子と考えられる蛋白質が結合することが示された²⁶⁾。またLTR上のκB配列に変異を導入すると、マイトジェンとホルボールエステルで刺激したJurkat細胞中での転写活性が消失することがCATアッセイ法によりわかり、このκB配列の重要性が明らかにされた²⁷⁾。

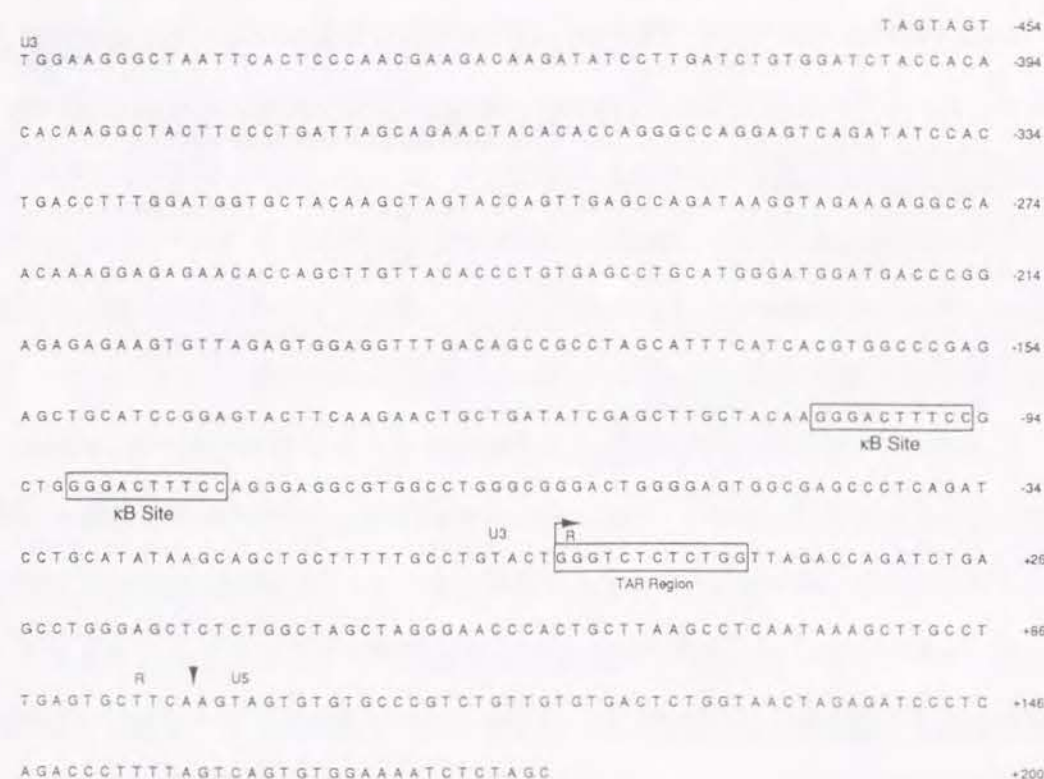


Figure 1-1. HIV-1 LTR (long terminal repeat) nucleotide sequences.

κB配列を認識する転写因子はNF-κBだけではないと予想されるため、次にいくつかのグループがκB配列に結合する他の転写因子の発見を目指した。1989年に石井らは、LTR上のκB配列に結合する蛋白質をコードするcDNAを、ヒトB細胞λgt11ライブラリーから、転写因子の単離において一般的な方法であるサウスウエスタン法により単離することに成功した。その蛋白質はHIV-EP1 (HIV-1 Enhancer Binding Protein) と命名された²⁸⁾。HIV-EP1は先に述べたNF-κBと異なり、亜鉛フィンガー蛋白質であることがわかった。また引き続いて、別の2つのグループがHIV-EP1と同じ蛋白質を単離して、PRDII-BF1²⁹⁾またはMBP-1³⁰⁾と呼んだ。ここで、この蛋白質は2717個のアミノ酸を含み全長は298kDと、それまでに知られる塩基配列特異的DNA結合蛋白質の中で最も大きいことがわかった²⁹⁾。また、この中には2つの亜鉛フィンガーが1630アミノ酸

をはさんで2組存在する（各組の間で~70%の相当性）というそれまでに例のないユニークな構造を持つことも明らかになった²⁹⁾。さらにHIV-EP1の染色体上の位置も明らかにされた³¹⁾。また、類似蛋白質HIV-EP2³²⁾およびHIV-EP3³³⁾が単離されたほか、 α A-CRYBP1³⁴⁾、AGIE-BP1³⁵⁾もそれぞれマウス、ラットから単離された。

通常、Jurkat T細胞中にはわずかな量のHIV-EP1 mRNAしか存在しないが、細胞をマイトジェンとホルボールエステルで刺激するとHIV-EP1 mRNAが発現する^{30,32)}。このことからHIV-EP1はT細胞の活性化に関与する転写因子であると推定された。しかしながらHIV-EP1の分子量は大きく実験しづらいこともあり、その詳細な機能はなかなか明らかにされなかった。それでもGaynorらは、 κ B配列を認識するもう1つの転写因子NF- κ BとともにHIV-EP1の遺伝子発現の機能の解明にも積極的に取り組み、1992年にHIV-EP1遺伝子のスプライシングによって生じた200kDと70kDの2つの蛋白質がHIV-1遺伝子を活性化することを報告した^{36,37)}。その後、完全な長さを持つHIV-EP1の実験に成功し、Jurkat細胞中でHIV-EP1がHIV-1遺伝子発現を活性化することをCATアッセイ法により示した³⁸⁾。また、おもしろいことにHIV-EP1はLTRの κ B配列だけでなく、 κ B配列と配列が似たTAR DNA (Figure 1-1) を認識することもフットプリンティング法やゲルシフト法により明らかになった³⁸⁾。TARはHIV-1の転写活性化に関わるHIV-1由来の蛋白質Tatが認識するRNAであり^{39,40)}、HIV-EP1はTatの機能制御にも関わっている可能性を示している。そればかりでなく、HIV-EP1には離れた位置に2組の亜鉛フィンガードメインが存在するが、1つがLTRの κ B配列に結合し、もう1つがTAR DNAに結合して環を形成するという特異な制御様式を予想することができる³⁸⁾。

エイズは感染しても発症しづらく、潜伏期間が平均10年と長い。これより、感染後に発症を抑えることも可能であると予想される。もし、感染者から発病を遅らせたり阻止することができれば、健常者と同じ生活を送ることができる。そこでHIV-1の遺伝子発現を阻止する薬物は、医薬品としても、HIV-1の遺伝子発現制御を解明するためのバイオリジカルツールとしても大きな意味を持つ (Figure 1-2)。また、エイズの治療薬など抗ウイルス剤の標的として、これまでにウイルス由来の蛋白質が最良であると考えられてきた。しかし皮肉なことに、阻害剤がウイルス由来の蛋白質に特異的である程、HIV-1の逆転写酵素阻害剤に見られるように耐性ウイルスが出現する可能性が高いことがわかってきた。この点からも、HIV-EP1のようにウイルスの活

動に関わる宿主細胞由来の蛋白質を標的とすることは意義深い。そこでこのような薬物を創るための第一段階として、まずHIV-EP1の機能を阻害したいと考えた。

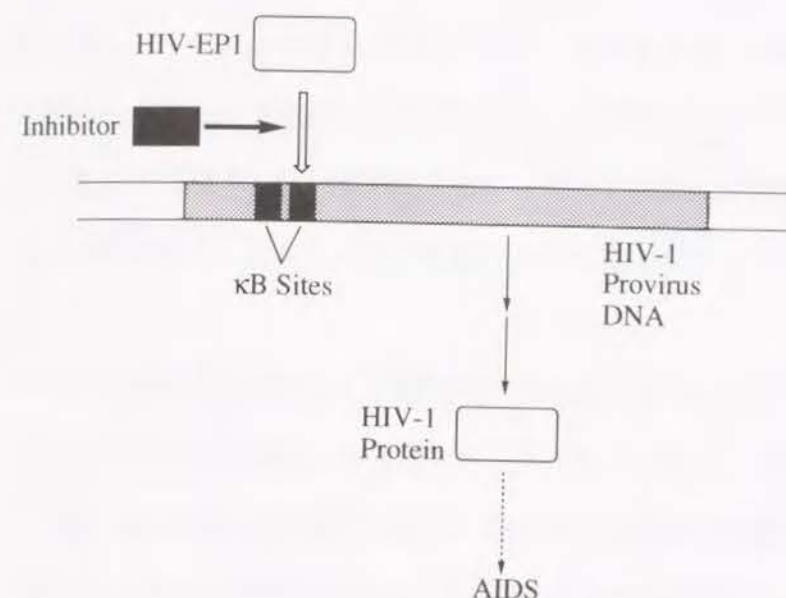


Figure 1-2. Inhibition of the function of HIV-EP1.

第二節 分子設計

HIV-EP1は、 C_2H_2 型亜鉛フィンガー蛋白質である^{28,30)}。この一群の蛋白質は、DNAと結合するために、亜鉛が2つのシステインと2つのヒスチジンに結合することで形成した指のような形をした亜鉛フィンガーを持つ⁴¹⁾ (Figure 1-3)。

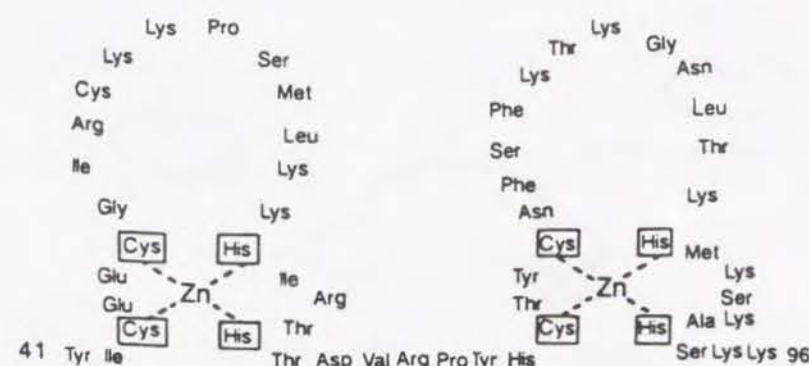


Figure 1-3. C terminal zinc finger domain of the HIV-EP1 protein.

既にC₂H₂型亜鉛フィンガー蛋白質Zif268とDNAの錯体のX線結晶解析が行なわれており、連続した亜鉛フィンガーがDNAに巻きつくようにDNA上の塩基と結合する様子が明らかにされている⁴²⁾。前節でも述べたように、HIV-EP1は、2つのタンデムなC₂H₂型亜鉛フィンガー(Figure 1-3)²⁸⁻³⁰⁾を離れた位置に2組持つ²⁹⁾。各組のC₂H₂型亜鉛フィンガーの構造はNMRスペクトルにより確かめられ、Zif268やこれまでNMRスペクトルで明らかにされたC₂H₂型亜鉛フィンガーと同様、逆平行βシートとα-ヘリックスを持つことが示された⁴³⁾。なお、HIV-EP1において離れた位置に存在する2組の亜鉛フィンガーは、それぞれκB配列にはほぼ同じ強さで結合することが明らかにされている²⁹⁾。

HIV-EP1がこのような亜鉛フィンガー蛋白質であることに着目し、阻害剤の設計を行なうことにした。すなわち、もしもHIV-EP1の亜鉛が配位子によって除去されると本来の立体構造を形成することができなくなり、HIV-EP1のDNA結合が不可能になると考えた(Figure 1-4)。既に、芳香族C-ニトロソ化合物やジスルフィド化合物(Figure 1-5)が、HIV-1の持つヌクレオキャプシド蛋白質やgag前駆蛋白質のC₂H型亜鉛フィンガーの亜鉛に結合するシステインを酸化することで、亜鉛と結合ができないようにすることが明らかとなった^{44,45)}。さらにおそらくこれによって、ヒトリンパ球におけるHIV-1の感染を阻害することが示唆された^{44,45)}。(なお、正常リンパ球細胞に対しては細胞毒性を持たないことも示されている。) 亜鉛フィンガーの亜鉛の除去は、この亜鉛フィンガーのシステインの酸化に代わるもう1つの方法である。そこで本研究では、亜鉛を効率的に引き抜く人工配位子を創ることにした。

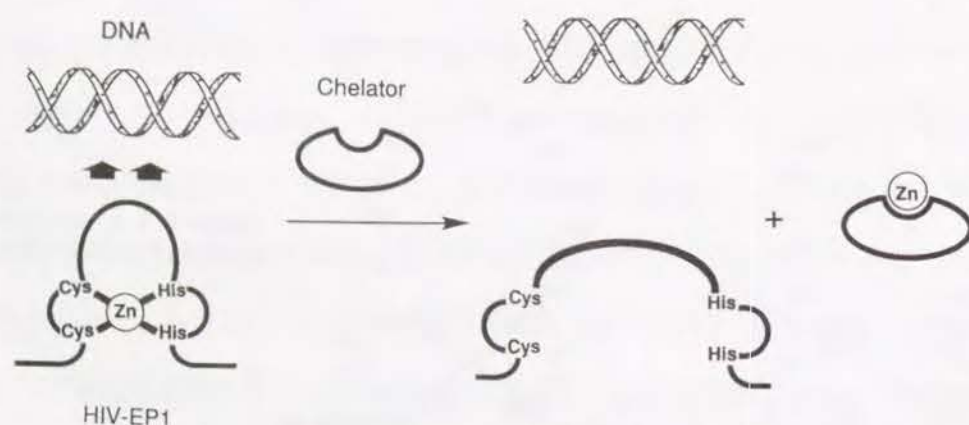


Figure 1-4. The removal of zinc from the zinc finger moiety of HIV-EP1.

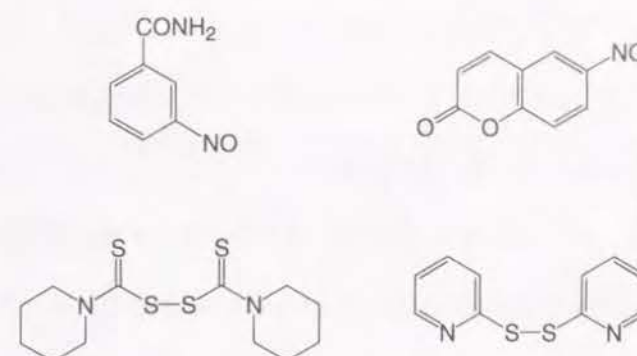


Figure 1-5. Structures of oxidants to eject zinc of zinc finger.

配位子の設計においては、自然界からヒントを得ようと考えた。生体内で亜鉛を選択的に強く取り込んでいる化合物には亜鉛蛋白質がある。その内、まず亜鉛酵素に着目した⁴⁶⁾。これまでに明らかにされた亜鉛酵素の亜鉛結合部位には、ヒスチジンのイミダゾール環が傑出して多く見られる⁴⁷⁾。2番目にはグルタミン酸のカルボキシル基、3番目にはアスパラギン酸のカルボキシル基とシステインのメルカプト基が多い⁴⁷⁾。例えばカルボニックアンヒドラーゼ⁴⁸⁾の亜鉛には3つのイミダゾール環と1つの水分子が、スーパーオキシドディスムターゼ⁴⁹⁾の亜鉛には3つのイミダゾール環と1つのカルボキシル基が、またカルボキシペプチダーゼ⁵⁰⁾の亜鉛には2つのイミダゾール環と1つのカルボキシル基と1つの水分子が配位していることがX線結晶解析により明らかになっている(Figure 1-6)。そこでイミダゾール環やカルボキシル基を持つ配位子を創れば亜鉛と強く結合すると考えた。

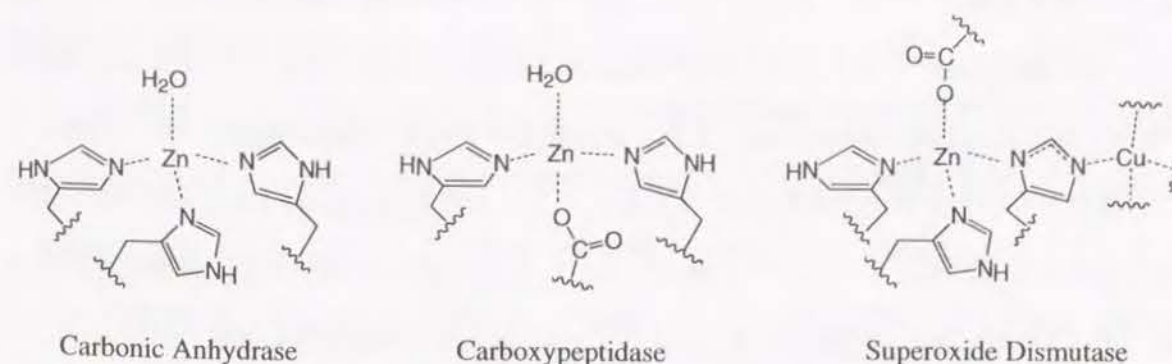


Figure 1-6. Zinc binding site of zinc enzymes.

最近、大塚、杉浦らは抗癌抗生物質ブレオマイシンの金属結合部位⁵¹⁾を、電子供与性の高い置換基が軸配位子となるように構築し直して、新しい機能性化合物**1-3**を合成した (Figure 1-7)^{52,53)}。ピリジン環のとなりにペプチドを持つ**1**は、銅錯体としてスーパーオキシド消去活性を有する。また、ピリジン環のとなりにアミノメチル基を持つ**2**、**3**は鉄錯体としてブレオマイシン様酸素活性化能力を持つ。(電子供与性の強いジメチルアミノ基を持つ**3**の方が**2**より高い酸素活性化能力を示した。)ピリジン環の窒素は sp^2 混成軌道中に共役に加わらない非共有電子対を持ち、イミダゾール環の窒素と性質に近い。(実際にイミダゾール環の代わりにピリジン環を使ったモデル化合物が多く報告されている。)このことから**1-3**は分子内に3個のイミダゾール環またはその等価体を持つということが出来る。

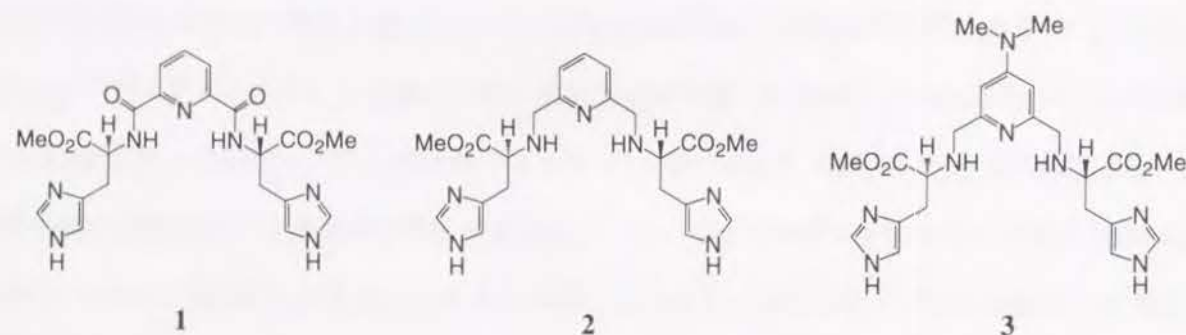


Figure 1-7. Structures of the synthetic chelators reconstructed from the bleomycin metal core.

そこで**1-3**を亜鉛配位子として転用するとともに (**1-3**は亜鉛酵素と配位数が異なると考えられるが)、**3**の鏡像体**4**や、イミダゾール環の配位能力を変化させるためにトリチル基を導入した**5**を合成することにした (Figure 1-8)。また、亜鉛酵素の亜鉛結合部位 (Figure 1-6)と同様に、ピリジン環とともにカルボキシル基を持つ**6**も合成しようと考えた (Figure 1-8)。**6**は、高い金属捕捉能力を持つために配位子として広く使用されているEDTA⁵⁴⁻⁵⁶⁾が持つアミノ酢酸部位を有するため、強い亜鉛配位効果が期待される。さらに、**3**からエステル部位を除いた**8**、**8**のイミダゾール環の代わりにカルボキシル基を持つ**9**、また比較対照としてジメチルアミノ基を持つ**10**も合成することにした (Figure 1-8)。

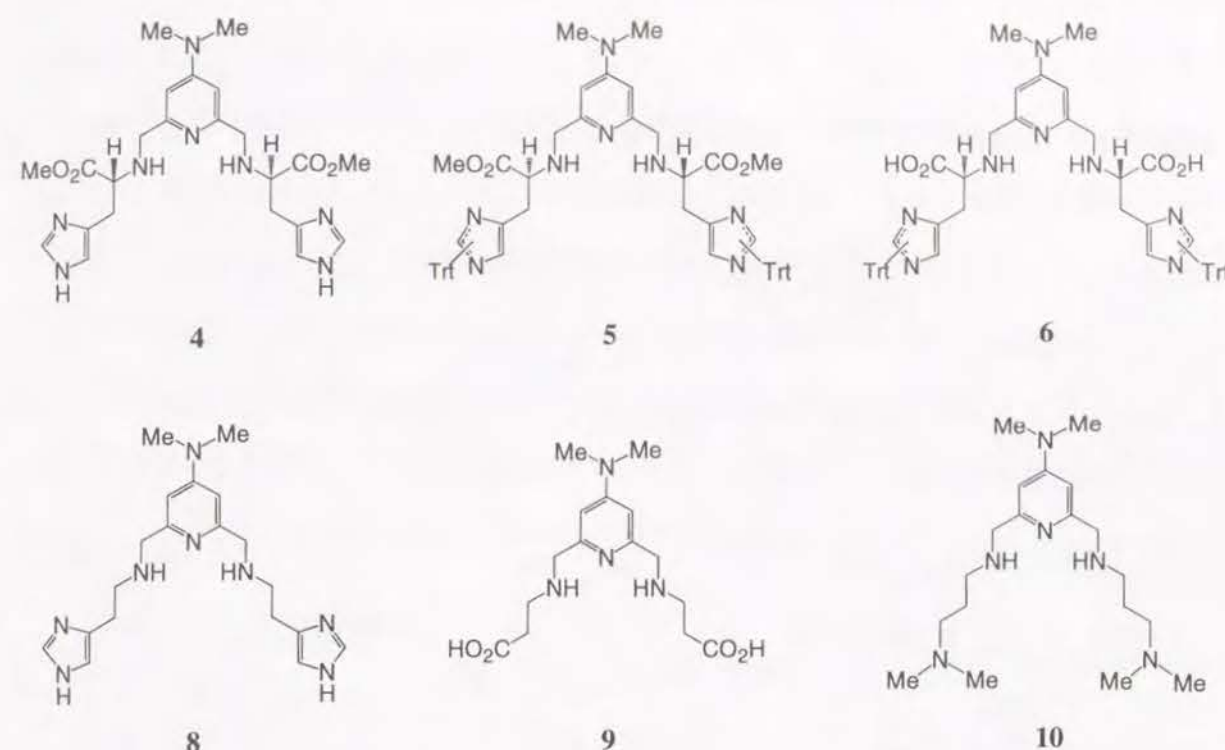
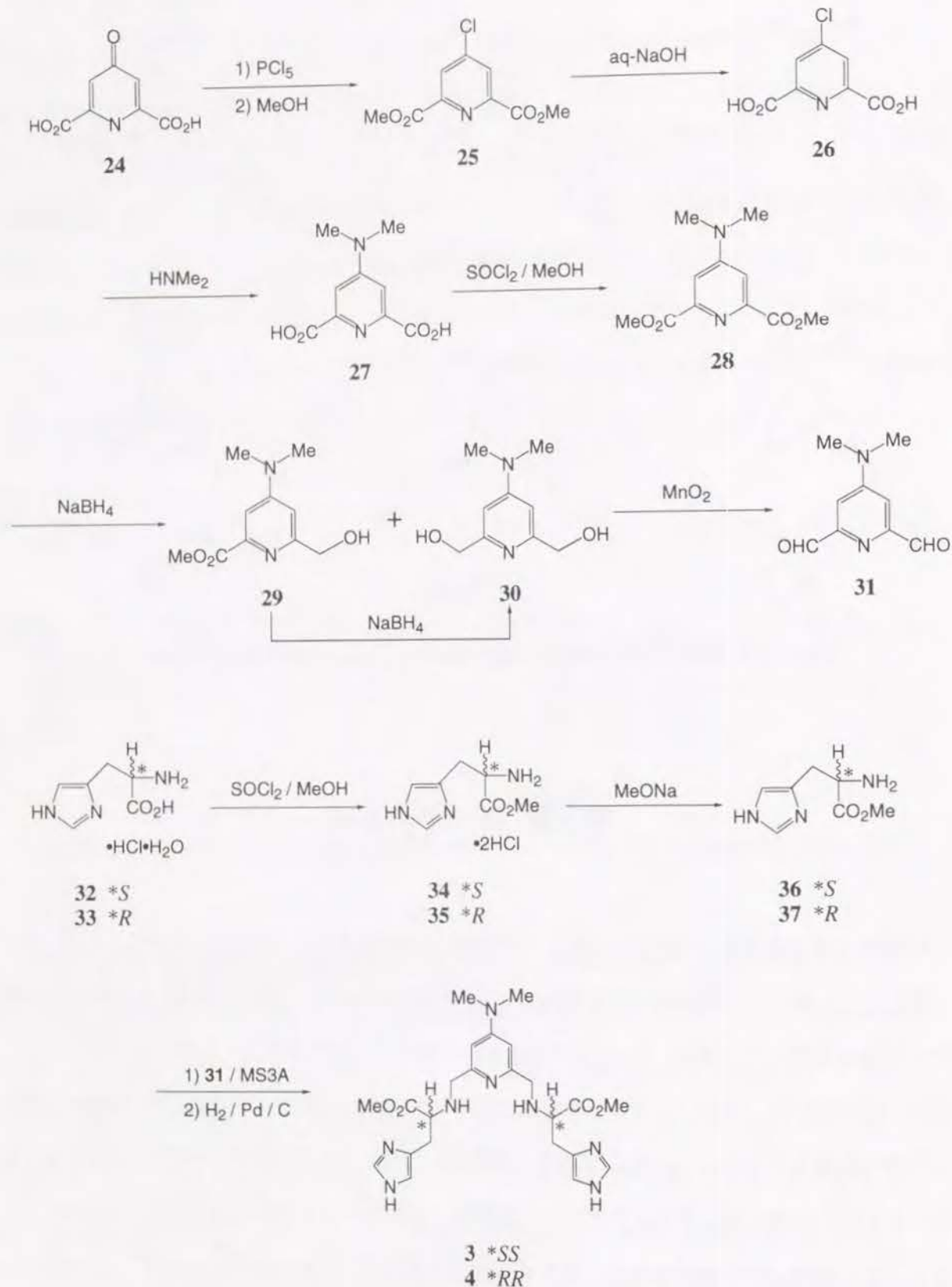


Figure 1-8. Structures of the designed chelators to remove zinc of zinc finger.

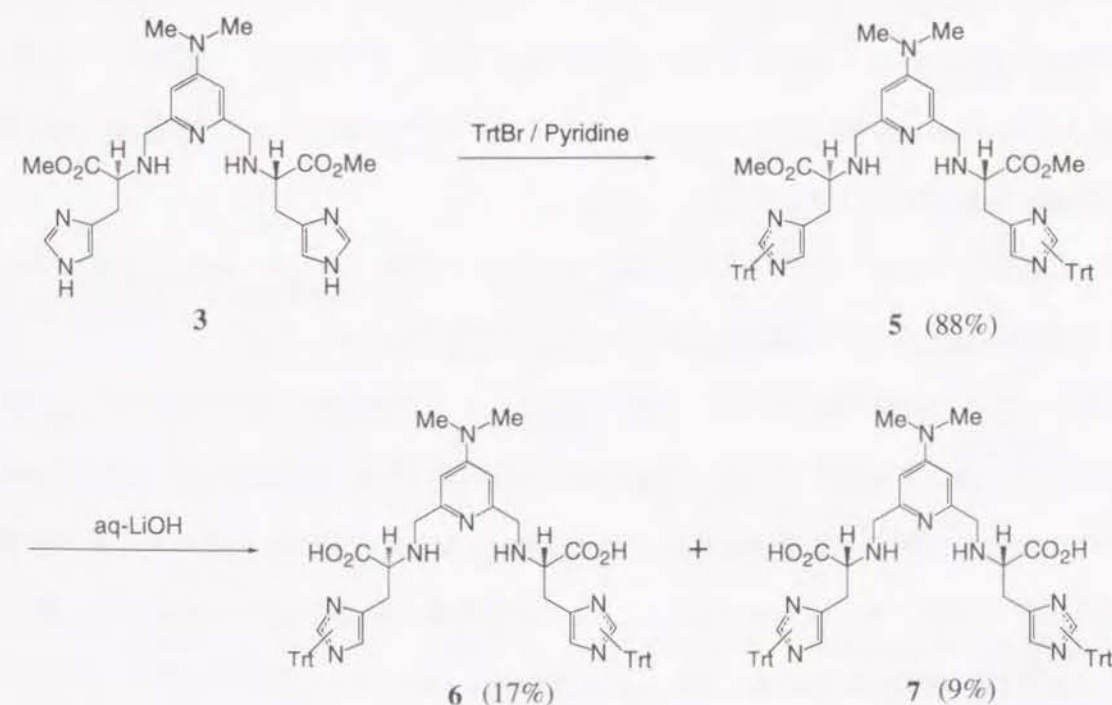
第三節 配位子の合成

3(*SS)とその鏡像体**4**(*RR)の合成は、既知法に従って行なった (Scheme 1-1)^{52,53)}。すなわち、まずケリダム酸**24**を出発原料として中間体である4-(ジメチルアミノ)ピリジン-2,6-ジカルボアルデヒド**31**を合成した。なお、2つのメチルエステル基を持つ**28**の水素化ホウ素ナトリウムによる還元反応において、1つのエステルのみが還元された**29**を与え、反応時間を延ばしても**29**はジオール体**30**に変換されなかった。そこで**29**を一度単離した後にさらに水素化ホウ素ナトリウムと反応させて**30**を合成した。またヒスチジン一塩酸塩一水和物のそれぞれの異性体**32**、**33**からメチルエステル体**36**、**37**に導いた後に、それぞれを**31**と反応させて**3**と**4**を得た。なお、**3**と**4**はシリカゲルカラムクロマトグラフィー上で分解が見られるため、カラムの操作は速く行なう必要がある。



Scheme 1-1. Synthesis of compounds 3 and 4.

Scheme 1-2に示すように、トリチル誘導体5は、3をピリジン存在下臭化トリフェニルメチルと処理することにより収率88%で得られた。5はシリカゲル分取用TLC (ジクロロメタン:メタノール = 5:1) により精製することができるが、合成中間体としては粗生成物をヘキサンで洗浄すれば充分であることがわかった。さらに5のメチルエステル部位をアルカリ条件下室温で加水分解すると、カルボキシル体6 (*SS) のほかにそのジアステレオマー7 (*RS) を与えた。精製前における6と7の生成比は6:7 = 60:40であった。(反応生成物に硫酸亜鉛を加え、NMRスペクトルにおけるそれぞれの亜鉛錯体の比率を調べた。) この生成比は反応時間を短くしたり、温度を5℃に下げても変化しなかった。(また精製した6と7は、それぞれアルカリ条件下で異性化が見られなかった。このことから、異性化はメチルエステルを持つ5において起こったと考えられる。)



Scheme 1-2. Synthesis of compounds 5 and 6.

6と7の分離をシリカゲル分取用TLCにより試みたところ、意外なことに6と7はTLC中の亜鉛を捕捉して[TLC (Merck 7747) 板には蛍光指示薬としてケイ酸亜鉛が含まれている]、それぞれの亜鉛錯体(6-Zn, 7-Zn)が収率19% (6-Zn) と22% (7-Zn) で生成した。(それぞれの異性体の立体構造は、旋光度の測定と亜鉛錯体の対称性を考えることにより決定した。すなわち、NMRス

ペクトル上でピリジン環の2位と6位の側鎖のシグナルが非等価に観測されたものをRS-体7とした。) これらが亜鉛錯体であることは、高分解能質量分析 [HRMS (FAB), calcd for $C_{59}H_{55}O_4N_8Zn$: 1003.3638, found: 1003.3685 (6-Zn), 1003.3661 (7-Zn)] と原子発光スペクトル (indusively coupled argon plasma atomic emission spectroscopy) の測定 (計算値の48%) により決定した。6と7のこの予想外の挙動から、その強い亜鉛の捕捉能力が予測された。なお、6-Znは74% eeであった [HPLC (カラム, CHIRALPAK AD; 0.46 x 25 cm; EtOH:n-ヘキサン:Et₂NH = 60:40:0.1; 保持時間, SS-異性体, 7.4分, RR-異性体, 10.2分) を用いて決定]。亜鉛フリーの6と7は、反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することによりそれぞれ収率17%、9%で得ることができた。精製前に反応混合物のpHを4にまで下げると6と7の分離は困難となったことから、カルボキシレートの状態での精製が必要と思われる。6、7と亜鉛錯体6-Zn、7-Znは¹Hまたは¹³C NMRスペクトルによっても区別することができるが、金属フリーのTLC板 (Merck 15552 Kieselgel 60F₂₅₄) を使用することにより簡便に確認できた [*R_f* 値, 6, 0.07; 6-Zn, 0.45; 7, 0.07; 7-Zn, 0.45 (CH₂Cl₂:CH₃OH = 1:1)]。

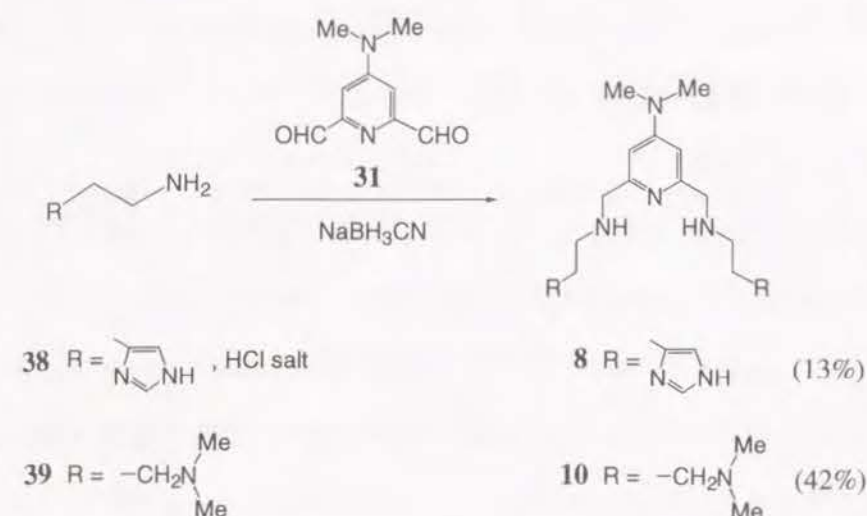
なお、別経路による6の合成のために、36と31の反応と同様にヒスチジン32 (塩酸フリー、無水) と31の反応を試みたが、2級アミノ化合物の生成は見られなかった。

8と10の合成は、3や4と同様にアミン38、39とアルデヒド31の縮合反応により Schiff 塩基を生成させた後、還元することで行なった (Scheme 1-3)。ただし、還元剤として水素の代わりにシアン化水素化ホウ素ナトリウムを用い、還元は *in situ* または段階的に行なった。その結果8と10が、それぞれ収率13%、42%で得られた。シアン化水素化ホウ素ナトリウムを用いると、副生成物として31の還元により生成した2,6-ジ(ヒドロキシメチル)-4-(ジメチルアミノ)ピリジンを生じるが、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離が可能である。

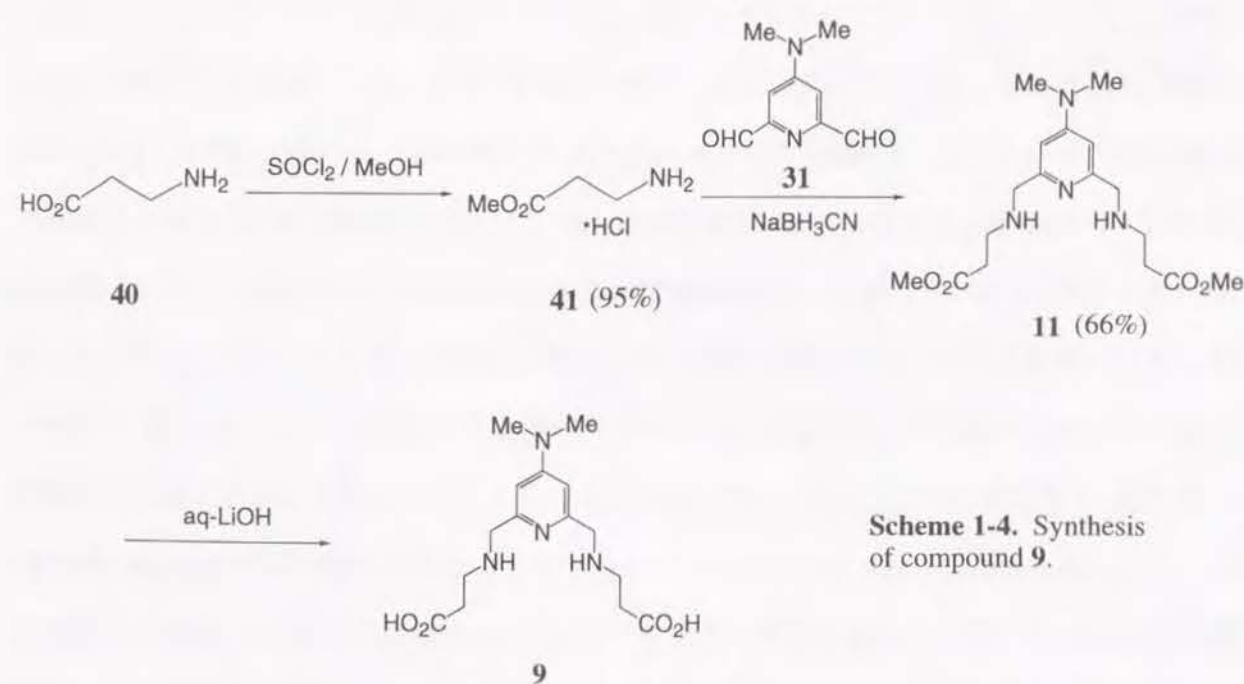
9の合成は11を経由して行なった (Scheme 1-4)。β-アラニン40をメチルエステル化して41を収率95%で合成した後、8の合成法に従って31と反応させることにより11が収率66%で得られた。11のメチルエステル部位をアルカリ条件下で加水分解することにより、9が得られた。9のシリカゲルクロマトグラフィーによる精製を試みたが分解が見られたため、粗生成物に含まれる9の量をNMRスペクトルにより定量してそのまま活性試験に用いることにした。

また計画した化合物のほかに、RS体7やメチルエステルを持つ中間体11も活性を調べることに

した。



Scheme 1-3. Synthesis of compounds 8 and 10.



Scheme 1-4. Synthesis of compound 9.

第四節 合成化合物の亜鉛配位能力

まず、合成化合物が設計どおり亜鉛を配位するかどうかについて調べた。6と7がTLC板中の亜鉛を配位することは、前節で述べたとおりである。まず、1-3および5-7をメタノールに溶か

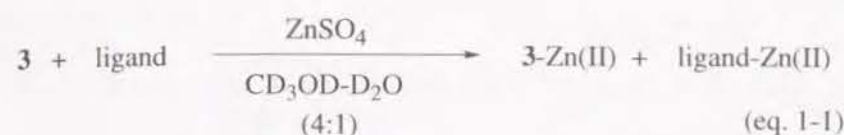
して1当量の硫酸亜鉛を加えたところ、対応する1:1の亜鉛錯体を与えた。**1-3**、**5-7**とそれぞれの亜鉛錯体は、 ^1H または ^{13}C NMRスペクトルやTLCなどにより明確に区別することができた。なお、**6**の亜鉛錯体は溶液中で2種類の異性体a、bとして存在することがわかった (CD_3OD 中でa:b = 83:17, $\text{CD}_3\text{OD}-\text{D}_2\text{O}$ (4:1) 中でa:b = 70:30)。

次に、これらの化合物の相対的な亜鉛配位能力を、**3**との競争反応により調べた (eq 1-1)。すなわち**3** (~1 equiv) と比較するligand (~1 equiv) を $\text{CD}_3\text{OD}-\text{D}_2\text{O}$ (4:1) に溶かして $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (<1 equiv) を加え、**3**、ligand、**3-Zn**、ligand-Znの4つの化合物の生成比を ^1H NMRスペクトルにおけるイミダゾールとピリジンのプロトンのシグナルの積分比から決定した。(阻害活性の測定は4%メタノールを含む水溶液中で行なう。しかしながらここで $\text{CD}_3\text{OD}-\text{D}_2\text{O}$ (4:1) を用いたのは、水に対する溶解性の低い化合物もあるが、明確なNMRスペクトルが得られる濃度にするためである。また、時間をおいてもスペクトルに変化が見られないことを確認した。)

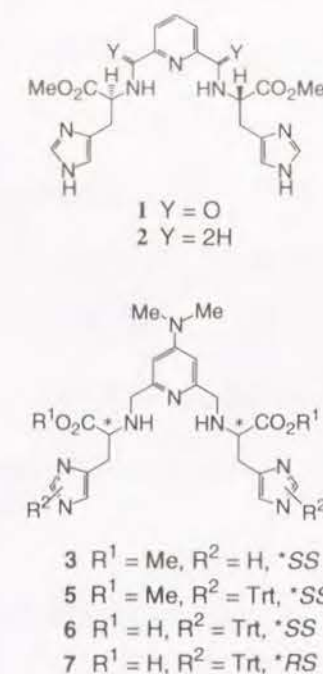
最初に、ピリジン環のとなりにペプチドを持つ**1**とアミノメチル基を持つ**2**について、先に述べた競争反応を行なった。その結果、加えた亜鉛は全て**2**と結合した。このように**1**と比べて**2**が高い配位能力を持つのは、**1**が偏平で固定されたペプチド結合部分を持つのに対し、**2**ではそれに代わって自由度の大きい二級アミノ基を持つことにより亜鉛と強く結合できるようになったためと考えられる。**3**とそのほかのligandの競争反応の結果をTable 1-1に示す。ピリジン環にジメチルアミノ基を持つ**3**の亜鉛配位能力は**2**のそれに比べて非常に強まった。これはジメチルアミノ基の電子供与効果によるものであろう。また、イミダゾール環にトリチル基を導入した**5**では、**3**に比べて亜鉛配位能力の減少が見られた。これはイミダゾール環の塩基性の減少や立体効果のためと考えられる。しかしながらメチルエステルをカルボキシル基に変えた**6**では、配位能力が10倍も強まった。さらに**6**のジアステレオマー**7**では最も強い配位能力を示した。なお、 CD_3OD 中でも同じ様な傾向が見られた。

さらに**7**と、配位子として生化学実験にも広く使用されているEDTA^{54,55,56)}の亜鉛配位能力を比べた。すなわち、**7** (1 equiv) とEDTA (1 equiv) を $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (4:1) に溶かして $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.9 equiv) を加えたところ、TLC (Merck 15552) 上で**7-Zn**の生成は全く見られなかった。これは、全ての亜鉛がEDTAに捕捉されたためと考えられる。また、**7-Zn** (1 equiv) を $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (4:1) に溶かしEDTA (1 equiv) を加えたところ、**7-Zn**は完全に消失し亜鉛フリーの**7**を与えることが

Table 1-1. Competitive zinc binding experiments of compounds **2**, **3**, **5**, **6**, and **7**. The ratio of zinc complexes were estimated by ^1H NMR spectroscopy.

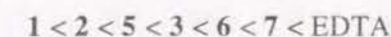


Ligand	[ligand-Zn] / [ligand]
	[3-Zn] / [3]
2	0
3	1.0
5	0.3
6	10
7	16



TLC (Merck 15552) 上で観測された。これは、EDTAが**7-Zn**から亜鉛を引き抜いたためと考えられる。このような結果から、**7**の亜鉛配位能力はEDTAには及ばないことがわかった。

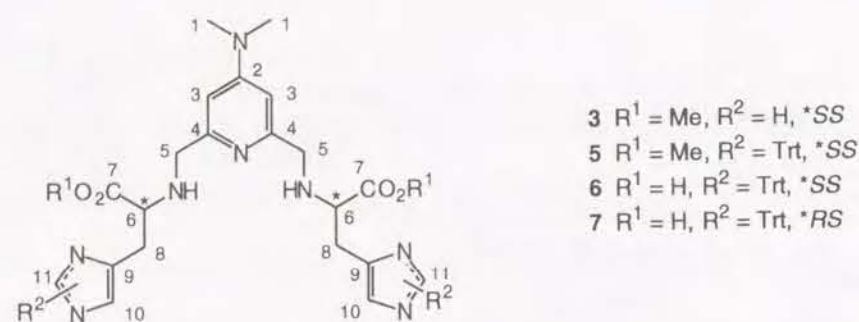
このようにして明らかにされた亜鉛の配位能力の順序をまとめると、



となる。

これらの合成化合物がどのようにして亜鉛に配位するのかに関する知見を得るために、 CD_3OD および/または $\text{CD}_3\text{OD}-\text{D}_2\text{O}$ (4:1) 中での、亜鉛フリーの化合物が亜鉛を配位した後の ^{13}C NMRスペクトルにおけるケミカルシフトの変化を調べた (^{13}C シグナルの同定はオフレゾナンススペクトルに基づいて行なった。)。結果をTable 1-2に示す。**6**のカルボニル炭素 (carbon 7) のケミカルシフトは、**3**、**5**のそれよりも変化が大きい。また、**6**、**7**のイミダゾール環内炭素の (carbon 9-11) のケミカルシフトは、**3**、**5**のそれよりも変化が小さい。**3-Zn**、**5-Zn**においては、1つのピリジン環の窒素、2つの2級アミノ、2つのイミダゾール環が亜鉛に配位していると考えられる。(3と似た2の銅錯体のX線結晶解析が行われ、このような5配位であることが示された

Table 1-2. Difference in ^{13}C chemical shifts between metal-free and Zn-chelated **3**, **5**, **6**, and **7**.



Ligand	Solvent ^a	Carbon								
		1	2/4 ^b	3	5	6	7	8	9/11 ^b	10
3	B	0.4	≥1.4	-1.1 -0.6	-1.3	1.8	-2.6	-3.4	≥2.8	-1.1
5	A	0.5	≥0.6	-0.6	-0.5	2.0	-2.5	-4.9	3.3	1.2
5	B	-0.2	≥1.8	-1.0	- ^c	0.0	-2.8	-4.9	≥2.8	1.3
6a	A	0.4	≥3.6	0.2	-3.5	1.2	-5.1	-2.1	1.4	0.9
6a	B	0.4	≥2.0	0.1	-3.2	0.8	- ^c	-2.7	≤2.2	0.8
6b	A	0.4	≥4.8	-0.3	-1.3	1.2	- ^c	-1.0	≤2.1	0.3
7	A	0.5	≥4.7	0.2 0.6	-3.7 -2.6	0.2 0.4	- ^c - ^c	-1.3 -0.8	≤2.4 ≤1.5	0.2 0.9
7	B	0.3	≥3.1	-0.4 -0.1	-2.6 - ^c	1.0 1.4	- ^c - ^c	-3.5 -2.4	≤1.9 ≤1.4	0.1 0.4

^aA: CD_3OD , B: $\text{CD}_3\text{OD}-\text{D}_2\text{O}$ (4:1)

^bx/y: Since signals for the carbons x and y could not be distinguished from each other, differences were calculated for all possible combinations of chemical shift values for x and y. Greater one of the values for carbon x and y is shown.

^cNot clear.

⁵³.) これに対して ^{13}C NMR スペクトルの結果は、**6**と**7**ではイミダゾール環に代わって2つのカルボキシル基が配位に関与していることを示していると考えられる。また、TLC [Merck 5714 [$\text{CH}_2\text{Cl}_2-\text{CH}_3\text{OH}$ (5:1)]] 上で**6-Zn**や**7-Zn**の R_f 値が**5-Zn**のそれに比べて大きいことも、**6-Zn**や**7-Zn**のカルボキシレートアニオンが亜鉛のカチオンによって中和され極性が下がったためと考えられ、 ^{13}C NMR スペクトルの結果と一致している (R_f : **6-Zn**, 0.58; **7-Zn**, 0.39; **5-Zn**, 0)。このようなカルボニル基の影響で、先に述べたように**6**と**7**が強い亜鉛配位能力を持つようになったと考えられている。これらの亜鉛錯体のX線結晶解析を行なうため、現在結晶化を試みている。[なお、**6**、**7**の銅錯体 (**6-Cu**, **7-Cu**) は**3**、**5**の銅錯体 (**3-Cu**, **5-Cu**) と似たESRパラメーターを示すことがわかった (g_{\perp} : **3-Cu**, 2.082; **5-Cu**, 2.079; **6-Cu**, 2.078; **7-Cu**, 2.078. g_{\parallel} : **3-Cu**, 2.370; **5-Cu**, 2.366; **6-Cu**, 2.371; **7-Cu**, 2.369. A_{\parallel} : **3-Cu**, 153.5; **5-Cu**, 150.3; **6-Cu**, 146.3; **7-Cu**, 143.5.)。]

第五節 HIV-EP1のDNA結合に対する阻害活性

実際に、ここで合成したイミダゾール環やカルボキシル基を持つ化合物がHIV-EP1とDNAの結合を阻害するかを検討した。阻害実験には、比較対照としてEDTAを用いることにした。またアッセイ法として、HIV-EP1と ^{32}P でラベルしたDNAの複合体を電気泳動により分離した後に検出するゲルシフトアッセイを用いた。なお実験には、HIV-EP1として、本来の蛋白質のC末端側の1組の亜鉛フィンガー付近の~340個のアミノ酸を含む部分²⁸⁾を使用した。またDNAとしては、マウス免疫グロブリン κ 軽鎖のエンハンサーの一部である、 κB 配列を含む二本鎖オリゴヌクレオチド (5'-AGCTTCAGAGGGGACTTTCCGAGAGG-3' and 5'-TCGACCTCTCGGAAAGTCCCCTCTGA-3') を用いた。阻害活性の評価は、HIV-EP1と阻害剤を20 °Cで30分間インキュベートした後にラベルしたDNAを加え、どの程度HIV-EP1とDNAが複合体を形成するかどうかをゲルシフトアッセイにより調べるにより行なった。なおこのアッセイは、すべてEDTA (1.5 mM) 存在下で行なった。EDTAは、大腸菌中で発現させたHIV-EP1に含まれる金属の狭雑物を除き、阻害活性に対する影響を避けるために加えた。

Figure 1-9には化合物**7**についての結果を示す。この写真において、上のバンドはHIV-EP1と

DNAの複合体、下のバンドはフリーのDNAを示す。すなわち上のバンドが阻害剤を加えていないコントロールのバンドに比べて薄くなっていることは、阻害が見られたことを意味する。バンドの放射活性はイメージアナライザーによって定量し、コントロールバンドの放射活性を100とした場合の相対的な数値を阻害活性とした。

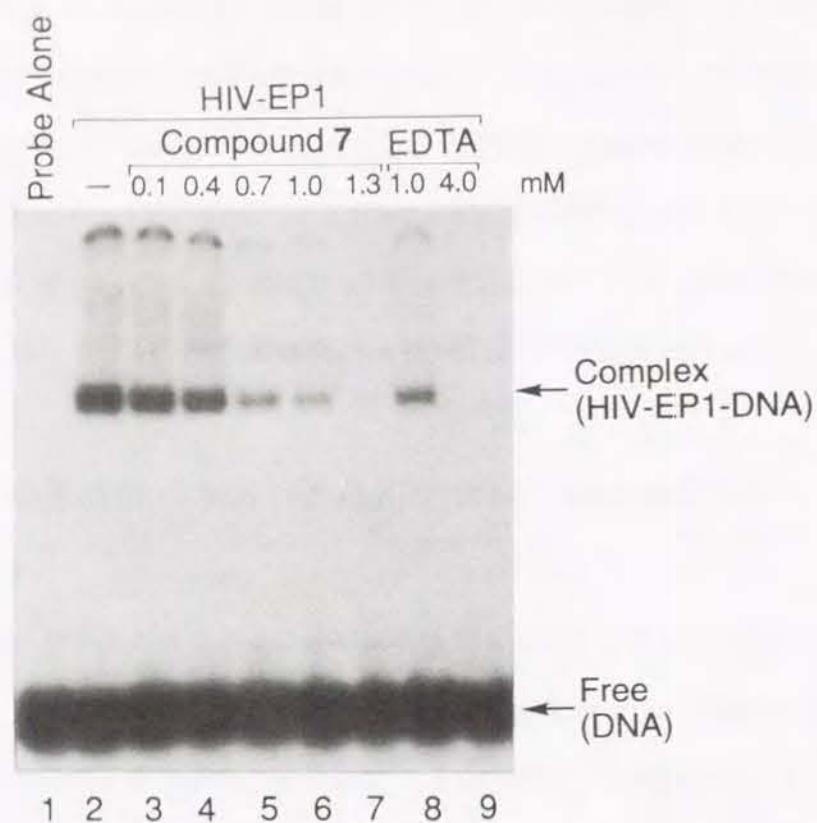


Figure 1-9. Effect of ligands **7** and EDTA on the DNA binding of HIV-EP1. HIV-EP1 was incubated with each sample in the presence of poly(dI-dC) at room temperature for 30 min. A radioactive double-stranded oligonucleotide containing a κ B site from the mouse κ light-chain enhancer was added. Sample was loaded onto a polyacrylamide band shift gel, and the gel electrophoresis was run.

合成した化合物の中でいくつかの化合物は、EDTAよりも強い阻害活性を示した (Figure 1-10)。すなわち300 μ Mの濃度で比較すると、ピリジン環のところにペプチドを持つ**1**はほとんど阻害活性を示さなかったが、ペプチドの代わりに二級アミノ基を持つ**3**、**4**は阻害活性を示し、ほとんどのバンドが消失した。(なお30 μ Mでの比較において、**3**とその鏡像体**4**の阻害活性には変化がみられなかった。) また100 μ Mでの比較において、ピリジン環の4位にジメチルアミノ基を持たない**2**とジメチルアミノ基を持つ**3**の阻害活性には変化が見られなかった。**3**のイミダゾー

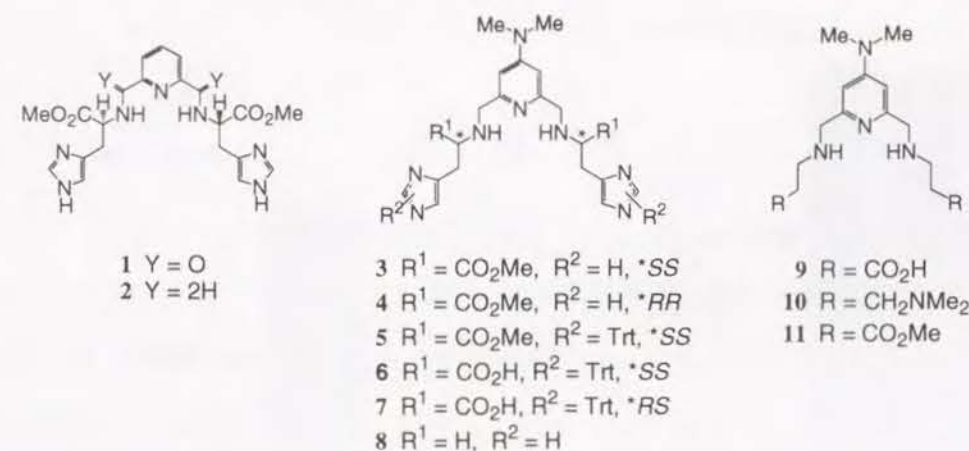
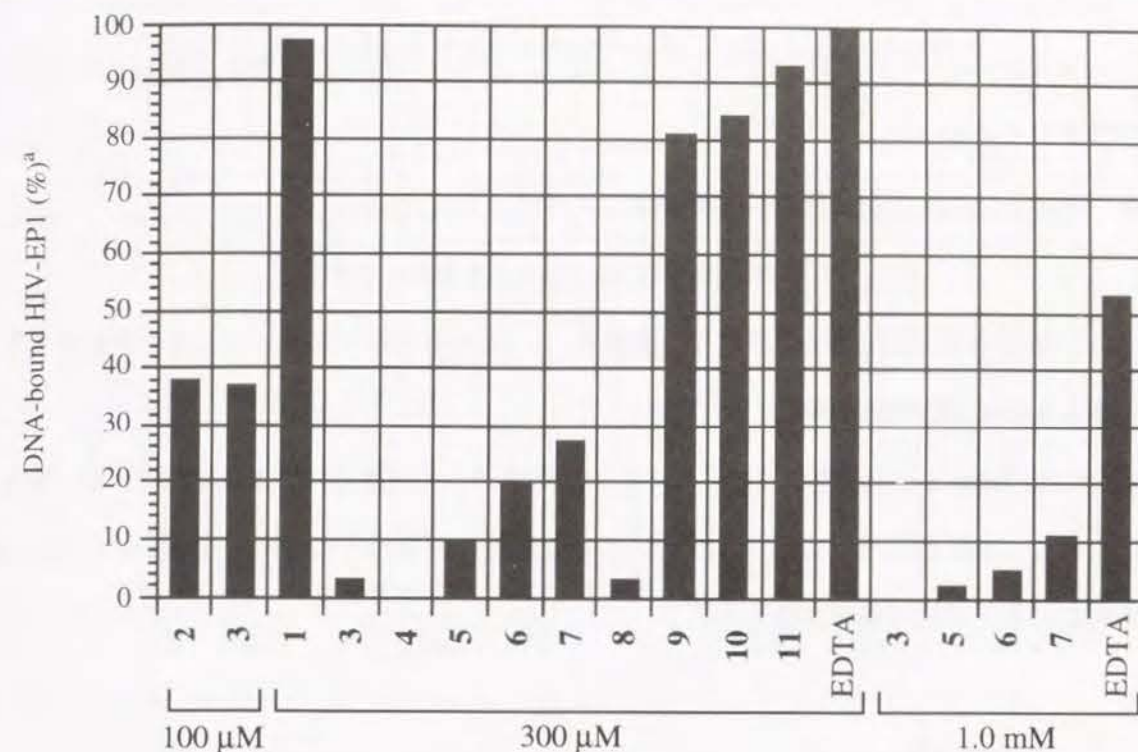


Figure 1-10. Effect of synthetic chelators and EDTA on the DNA binding of HIV-EP1. ^aQuantitation of radioactivity of the electrophoretic band was conducted using an image analyzer.

ル環にトリチル基を導入した**5**では阻害活性が低下した。**5**にカルボキシル基を導入した**6**や**7**ではさらに阻害活性の低下が見られた。また**3**からエステル部位を除いた**8**では、**3**と同様に阻害活性を示した。(なお、HIV-EP1とDNAを結合させた後に300 μ Mの**8**を加えたところ、阻害活性

の低下が見られた。DNA-bound HIV-EP1: 42%) これに対してイミダゾール環に代わってカルボキシル基を持つ**9**、ジメチルアミノ基を持つ**10**、エステルを持つ**11**、およびEDTAはほとんど阻害活性を見せなかった。

ここで明らかとなった阻害活性の順序をまとめると、

1, 9, 10, 11, EDTA < 7 < 6 < 5 < 2, 3, 4, 8

であった。同様の傾向は1 mMの濃度でも見られた。また30 μ Mの**3**は、半分近くの結合を阻害した (DNA-bound HIV-EP1: 60%)。

Figure 1-11, Table 1-3に示すように、**3**によって阻害されたHIV-EP1とDNAの結合は、亜鉛を加えることにより回復した。また、**3**の亜鉛錯体は阻害効果を示さなかった (Figure 1-12)。**8**についてもこれらと同様の効果が見られた。

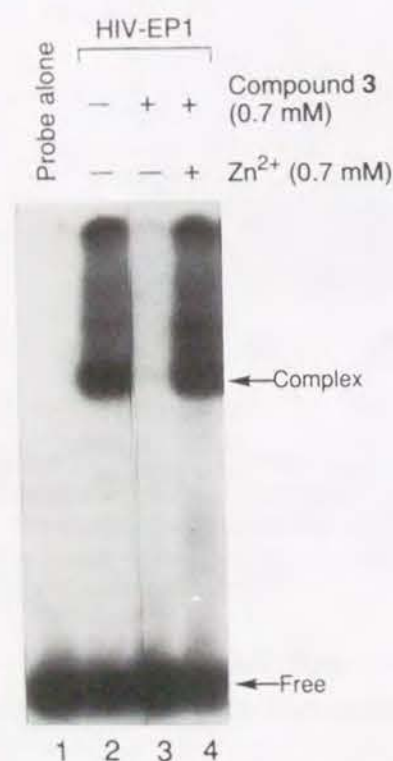


Figure 1-11. Effect of ZnSO_4 (1 equiv of **3**, introduced before the addition of HIV-EP1).

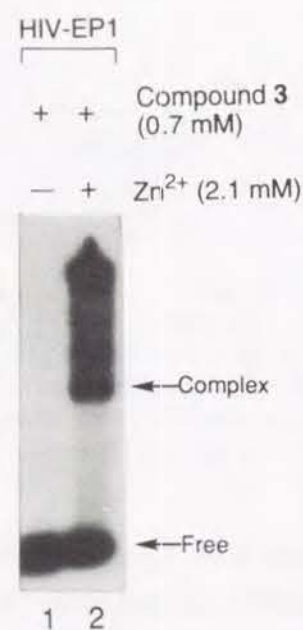


Figure 1-12. Effect of ZnSO_4 (3 equiv of **3**, introduced after the addition of HIV-EP1).

Table 1-3. Effect of zinc in the inhibition of the DNA binding of HIV-EP1 by compound **3**.

no.	compound	Zn	DNA-bound HIV-EP1 (%) ^a
1	3 (0.7 mM)	-	0
2	3 (0.7 mM)	0.7 mM ^b	100
3	3 (0.7 mM)	2.1 mM ^c	100
4	3 (1.0 mM)	-	0
5	3 (1.0 mM)	1.0 mM ^b	99
6	3 (1.0 mM)	1.0 mM ^c	77
7	3 (1.0 mM)	2.0 mM ^c	94

^aQuantitation of radioactivity of the electrophoretic band was conducted using an image analyzer. ^b Zn^{2+} was added before addition of HIV-EP1.

^c Zn^{2+} was added after the addition of HIV-EP1

第六節 考察

このように、人工配位子を用いてHIV-EP1-DNAを効率的に阻害することができた。この効率的な阻害がどのような機構で行なわれるかについては、次のように考えることができる。**3**や**8**による阻害反応の後に亜鉛を加えるとHIV-EP1-DNAが回復すること、亜鉛錯体が阻害効果を示さないことから、この配位子がHIV-EP1の亜鉛フィンガーから亜鉛を除去することにより、HIV-EP1が本来の立体構造を形成できなくなってDNAに結合できなくなったと考えられる。

さらに、強い阻害活性を示した**3**がDNAと相互作用しないことを確かめた。すなわち、エチジウム置換実験を、阻害実験に用いた二本鎖DNAオリゴヌクレオチド (^{32}P でラベルしていないもの)を用いて行なった。エチジウムブロマイド (2.1 μ M) をDNAに結合させた後に**3** (50 equiv)を加えたが、DNAとエチジウムブロマイドに起因する蛍光スペクトルに変化は見られなかった。なお、DNAと相互作用することが知られるディスタマイシン A (50 equiv)を用いて同じ条件で

実験を行なったところ、濃度依存的に蛍光の減衰が見られ、エチジウムブロマイドとの置換が進行したことが示されている。またpBR322プラスミドDNAの*Bam*HI-*Sph*Iフラグメントを用いたDNase Iフットプリンティング実験も行なったが、**3** (1 mM) を加えても変化は見られなかった。(同じ条件で、エルサミシン Aによるフットプリントは観察されている。) これらより、**3** はDNAと相互作用しないと考えられる。

また第三章で述べるように、**3** (1 mM) はNF- κ Bの(p65)₂とDNAの結合を阻害しない。(p65)₂とDNAの結合は比較的弱いこと⁵⁷⁾から、もし**3**がDNAと相互作用することでHIV-EP1-DNAを阻害するのであれば、(p65)₂とDNAとの結合をも阻害すると思われる。このことも先の結果を支持している。

このように阻害の機構が設計どおりの亜鉛の除去によることが示されたが、必ずしも亜鉛に高い配位能力を持つ化合物が強い阻害効果を示さなかった。亜鉛の配位能力の順序は**1** < **2** < **5** < **3** < **6** < **7** < EDTAであったが、阻害効果の順序は**1**, EDTA < **7** < **6** < **5** < **2, 3**であった。**5**、**6**、**7** はトリチル基の効果で水に溶けづらいために阻害効果が高まらなかったことは考えられる。しかし、EDTAは**2**や**3**に比べて非常に強い亜鉛の配位能力を示したにもかかわらず、阻害効果は**2, 3**の方がEDTAよりもかなり強かった。これは、この阻害反応が速度論的支配を受けているためと考えている。すなわち、阻害剤が亜鉛に近づいて生じた遷移状態(または不安定中間体、亜鉛が4配位であるか5配位であるかは不明である)が、**2**、**3**によって生じたものの方がEDTAのそれよりも電子的効果や立体効果などによって安定であるために、**2**、**3**の阻害反応が速く進行するからであろう。

この**2**、**3**の持つイミダゾール環が有効であることは、エステル基を持たない同じ構造の**8**、**9**、**10**、**11**中の阻害活性の比較においても示されている。すなわちイミダゾール環を持つ**8**は、同じ骨格においてカルボキシル基、ジメチルアミノ基、エステルを持つ**9**、**10**、**11**に比べて阻害活性が非常に高い。始めに亜鉛酵素の亜鉛結合部位にイミダゾール環が多く見られることからイミダゾール基を持つ人工配位子を分子設計したが、この着眼は間違っていなかったように思われる。(亜鉛酵素の亜鉛は4配位である。この阻害反応において重要なのは先に述べたように遷移状態であると考えられため、人工配位子が4配位でないことは問題にはならなかったと思われる。)

これに対して、EDTAの阻害効果の少ないことや、同じトリチル基を持つ**5**と比較してカルボ

キシル基を持つ**6**、**7**の阻害活性が低いことから、カルボキシル基は効果的でないようである。なお、ピリジン環の4位にジメチルアミノ基を持たない**2**も**3**とほぼ同じ阻害効果を示したが、**3-11**のジメチルアミノ基は分子の水溶性を上げるためには有効な役割を果たしたと考えている。

また、**3**と1当量の塩化銅から生成した**3**の銅錯体(**3**-Cu)もHIV-EP1-DNAを阻害することがわかった [DNA-bound HIV-EP1: 2% (0.7 mM **3**-Cu), 71% (0.7 mM CuCl₂)]. これは、**3**-Cuの銅が亜鉛フィンガーの亜鉛と置換し、Cu²⁺が亜鉛が除去されたフィンガー部位を酸化するためである可能性もある。亜鉛フィンガーからの亜鉛の引き抜きとメルカプト基の酸化を同時に行なうことも新しい阻害方法であると考えている。

なお、トリチル基を持つ**5**は鉄錯体として**3**よりも強い酸素活性化能力を持つことが示された。また、おそらくこの酸素活性化能力に起因して細胞中でアポトーシス誘導能を持つことが梅沢らにより明らかにされている⁵⁸⁾。

第二章

メルカプト配位子による効率的な阻害

第一節 序論および分子設計

前章においては、亜鉛フィンガー蛋白質HIV-EPIから亜鉛を引き抜く人工配位子の設計にあたって、亜鉛酵素の亜鉛結合部位にヒントを得た。酵素でない亜鉛蛋白質には、亜鉛フィンガー蛋白質のようにその亜鉛が蛋白質の立体構造を安定化させる役割を担うものがある。そこで本章では亜鉛フィンガー蛋白質の亜鉛結合部位に着目して、HIV-EPIの阻害剤を再設計することにした。酵素の亜鉛結合部位は亜鉛と結合するだけでなく、亜鉛に触媒的機能を授けるようにもできていると考えられる。これに対して亜鉛フィンガー蛋白質の亜鉛結合部位は、亜鉛と強く結合するだけであるから、このような設計に構造に期待が持たれる。

亜鉛フィンガー蛋白質にはC₂H₂型、C₃H型、C₄型、C₆型などがあるが (Figure 2-1)⁴¹⁾、これまでに知られるすべての亜鉛フィンガーはシステインのメルカプト基を持つ。

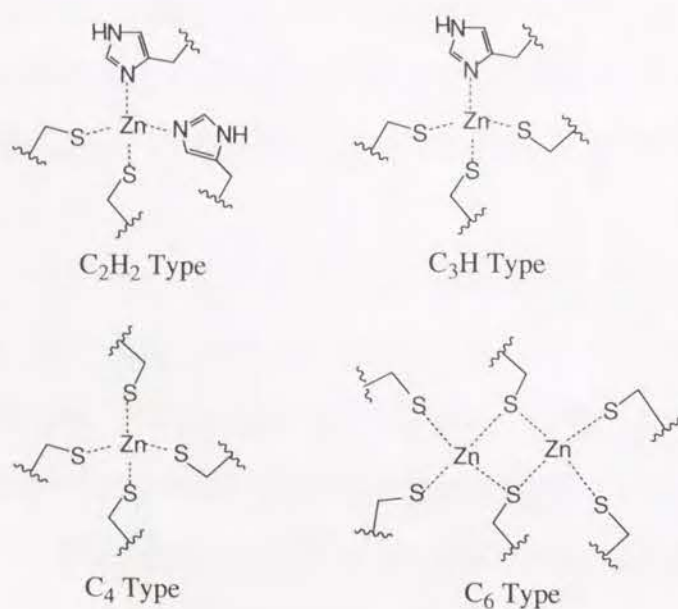


Figure 2-1. Zinc binding site of zinc finger proteins.

実際にシステインの亜鉛錯体は、ヒスチジンなどその他のアミノ酸の亜鉛錯体に比べて高い安定度定数を持つ^{59,60)}。このようなメルカプト基と亜鉛の独特の強い結合は、電子の逆供与が亜

鉛の $d\pi$ 軌道から硫黄の $d\pi$ または $p\pi$ 軌道へ起こり得ることにより説明される⁶¹⁾。そこでメルカプト化合物を合成し、HIV-EPIの機能の阻害を強めることが可能と考えた。

まず、第一章で強い阻害効果を示した人工配位子3や8の4-ジメチルアミノピリジン部位を残し、イミダゾール環に代わってメルカプト基を持つ化合物12および13を合成することにした (Figure 2-2)。3や8の2級アミノとイミダゾール環が亜鉛に配位すると、6員環を形成することになる (Figure 2-3)。しかし、6員環だけでなく5員環も安定であると考え、13の他に炭素鎖の短い12も合成することにした (Figure 2-3)。さらに比較のためにメチルチオ化合物14、15などのアルキルチオ化合物や、ヒドロキシル基（酸素は周期表上で硫黄のすぐ上に位置する）を持つ19も合成しようと考えた (Figure 2-2)。

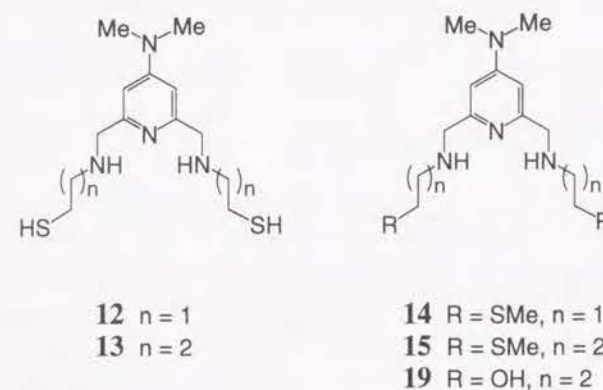


Figure 2-2. Structures of the designed chelators having mercapto and related groups.

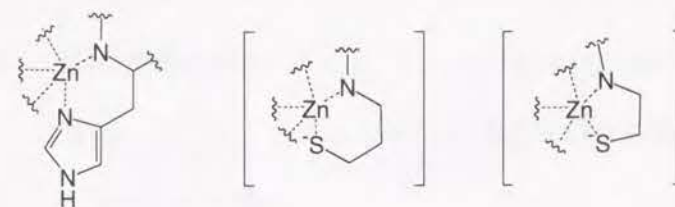
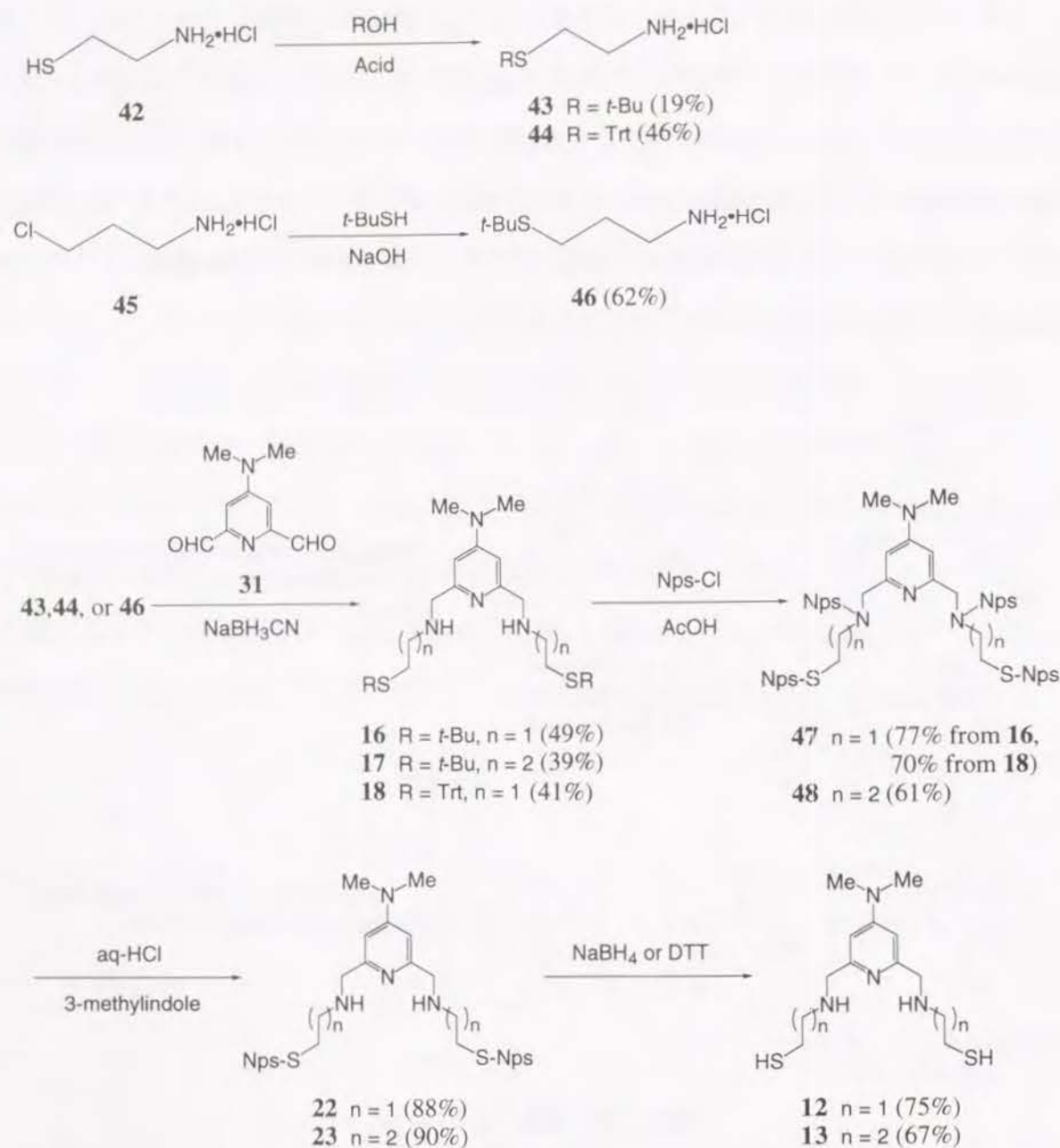


Figure 2-3. Zinc-chelating mode of the synthetic chelators.

第二節 配位子の合成

12および13を、第一章における化合物と同様にアミンとアルデヒド31から合成するためには、メルカプト基に保護基を導入することが必要である。保護基としては、金属を使用せずに高収率で除去できるもの（扱う化合物が配位子であるため金属は取り込まれる可能性があり、また生成物の精製が困難なことが予想されるため）、保護基を導入した中間体も阻害実験の比較対

照としての意味を持つものという観点から、*tert*-ブチル基およびトリチル基を選んだ。合成は Scheme 2-1 に従って行なった。



Scheme 2-1. Synthesis of compounds 12 and 13.

すなわち、まず2-アミノエタンチオール塩酸塩 (42) または3-クロロプロピルアミン塩酸塩 (45) を出発原料とし、保護基である*tert*-ブチルチオ基またはトリチル基を持つアミン体43、44、

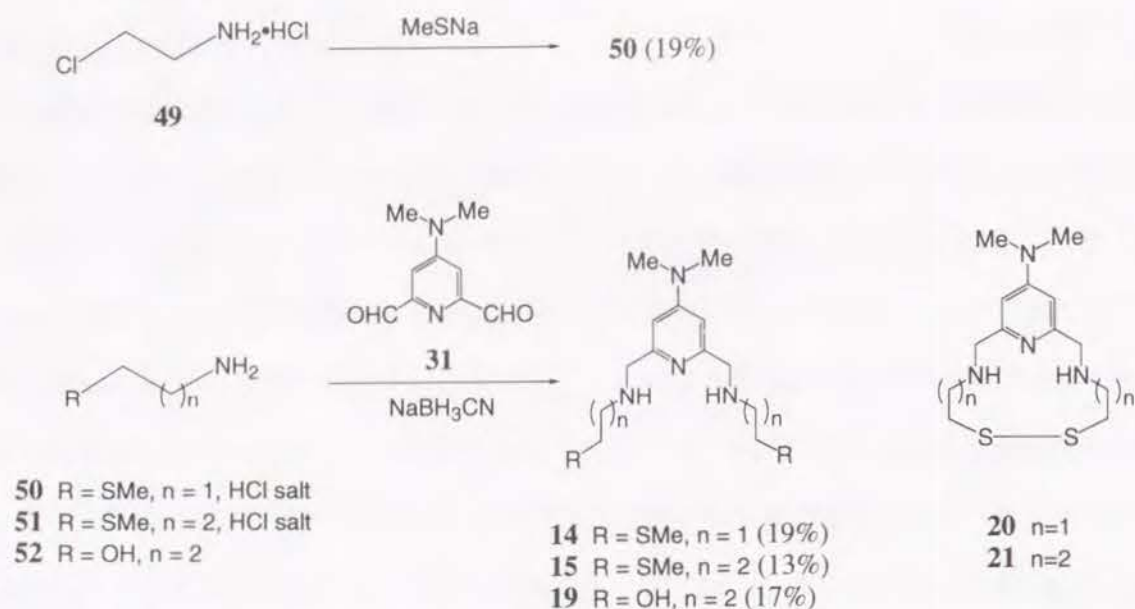
46をそれぞれ19%、46%、62%で合成した。(別途の方法などによる43⁶²⁾、44⁶³⁾、46⁶⁴⁾の合成は既に報告されている。)

次にアミン体43とアルデヒド31から、8と同様に(第一章に記載)シアン化水素化ホウ素ナトリウムを用いて、16を収率49%で合成した。次の脱保護反応は2-ニトロフェニルジチオ体を経由して行なうことにした。16を酢酸中で塩化2-ニトロベンゼンスルフェニル (Nps-Cl) で処理したところ、2級アミンにも2-ニトロフェニルチオ (Nps) 基が入った47が収率77%で得られた。

(*tert*-ブチル基の代わりにトリチル基を用いることもできる。すなわち同様の方法で44から18を収率41%で合成した後に、収率70%で47を得ることもできた。) このアミン上の置換基のみを3-メチルインドール存在下酸性条件にて除去したところ、目的物のチオール部位がジスルフィド化された22が収率88%で得られた。22に還元剤NaBH₄を加えると、Nps基に起因すると思われる反応溶液の色の変化(黄色→オレンジ色)が見られた。引き続きpHを1にして副生成物の2-ニトロフェニルチオール (Nps-H) をジクロロメタンで洗浄して除去した後に、pHを6-7に合わせてジクロロメタンで抽出することにより12を収率75%で得ることができた。この際、12が酸化されないように十分な注意が必要である。また、Nps-Hを除去した後に酸性水溶液を濃縮することで、12の塩酸塩が得られた。12の塩酸塩は12に比べて空気酸化を受けにくい、潮解性を持つ。また、46を出発原料にして同様の方法で13およびその塩酸塩を得ることもできた。

メチルチオ体14、15はそれぞれ、2-クロロエチルアミン塩酸塩49から合成した50(別途の方法による合成は報告されている⁶⁵⁾)から収率19%、51(HClフリー体は市販)から収率13%で合成した(Scheme 2-2)。また、ヒドロキシル体19も同様にしてアミン52から収率17%で得ることができた(Scheme 2-2)。

12と13は空气中で容易に酸化され、ジスルフィド体を与える。その主な生成物は、HRMSからそれぞれの環状ジスルフィド20、21と考えられる(Figure 2-4, 20: HRMS calcd for C₁₃H₂₂N₄S₂: 298.1286. found: 298.1307; 21: HRMS calcd for C₁₅H₂₆N₄S₂: 326.1598. found: 326.1573.)。ジスルフィド20-23は空气中で安定であり、扱いやすい。また、3当量のジチオスレイトール(DTT)を加えると、すぐに20-23は完全に消失し、対応するメルカプト体12、13が生成する。阻害活性試験で用いる緩衝溶液中には1.5 mMのDTTが含まれることから、20-23を12、13の実際上の等価体として用い、*in situ*で12、13を発生させることにした。



Scheme 2-2. Synthesis of compounds **14**, **15**, and **19**.

Figure 2-4. Structures of disulfide **20** and **21**.

第三節 HIV-EP1のDNA結合に対する阻害活性および考察

合成したメルカプト化合物および関連化合物**12-19**の阻害活性を、ゲルシフトアッセイ（第一章に記載した方法に従う）により調べた。この際、比較として第一章で強い阻害活性を示した**3**を用いた。結果をFigure 2-5、2-6に示す。

環状ジスルフィド**20**、**21**から発生させた**12**、**13**と、2-ニトロフェニルジチオ体**22**、**23**から発生させた**12**、**13**はそれぞれほぼ同じ阻害活性を示した。明らかにメルカプト化合物**12**、**13**の阻害活性は、イミダゾール化合物**3**のそれに比べて高いことがわかった。最も強い阻害活性を示した化合物は炭素鎖の短い**12**であり、30 μM でほぼ完全にHIV-EP1-DNAを消失させた。（なお、HIV-EP1とDNAを結合させた後に30 μM の**12**を加えたところ、阻害活性の低下が見られた。DNA-bound HIV-EP1: 51%）それに対して**3**がほぼ完全にHIV-EP1-DNAを消失させるためには300 μM は必要であった。なお、**12**による阻害には濃度依存性が見られ、その IC_{50} は $\sim 4 \mu\text{M}$ であった。従って**12**は**3**よりも10倍以上強い阻害活性を示すといえる。また、メチルチオ、*tert*-ブチルチオ、トリチルチオ体**14-18**、ヒドロキシル体**19**、2-アミノエタンチオール、グルタチオン、

DTTなどのほかのメルカプト化合物の阻害活性は**12**、**13**のそれに比べてかなり弱い。しかし**14-18**は300 μM の濃度では阻害活性を示し、この中ではトリチルチオ体**18**が最も強い阻害活性を示した。また、**12**の構造の一部である2-アミノエタンチオールも30 μM でわずかな阻害活性を示しているようである。

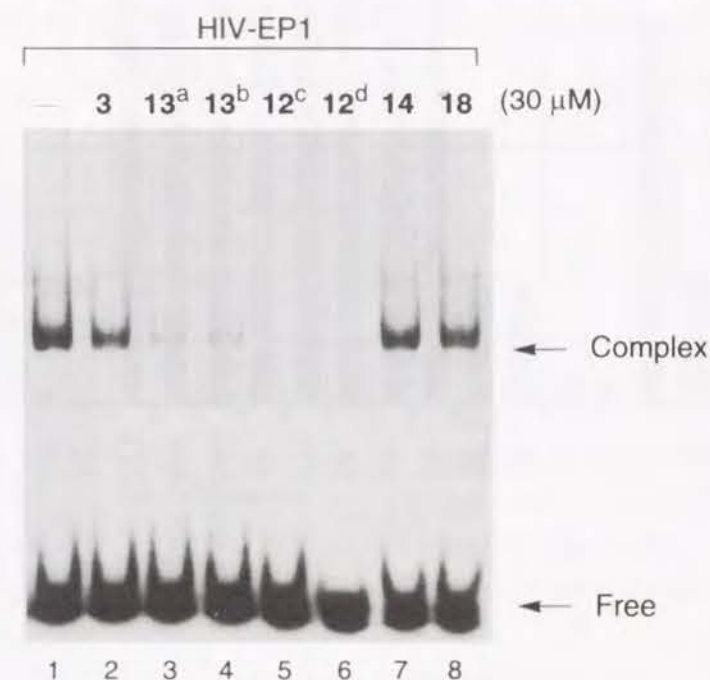


Figure 2-5. Effect of synthetic chelators (30 μM) on the DNA binding of HIV-EP1. After HIV-EP1 was incubated with each chelator in the presence of poly(dI-dC) at room temperature for 30 min., a radioactive DNA probe containing a κB site from the mouse κ light-chain enhancer was added. Sample was loaded onto a polyacrylamide band shift gel, and the gel electrophoresis was run. ^aGenerated from **21**. ^bGenerated from **23**. ^cGenerated from **20**. ^dGenerated from **22**.

第一章で述べたように、**3**によって阻害されたHIV-EP1とDNAの結合は亜鉛を加えると回復する。また、**3**の亜鉛錯体は阻害効果を示さない。このことから、**3**による阻害は亜鉛フィンガーからの亜鉛の除去に起因すると考えられた。これに対して**12**や**13**によって阻害されたHIV-EP1とDNAの結合は、亜鉛を加えても回復しなかった (Figure 2-7, Table 2-1)。また D_2O 中3当量のDTT存在下、**12**に1当量の硫酸亜鉛を加えてpHを7に合わせると ^1H NMRから亜鉛錯体と推定される化合物が得られる。こうして得た**12**の亜鉛錯体も阻害効果を示さなかった (Figure 2-7,

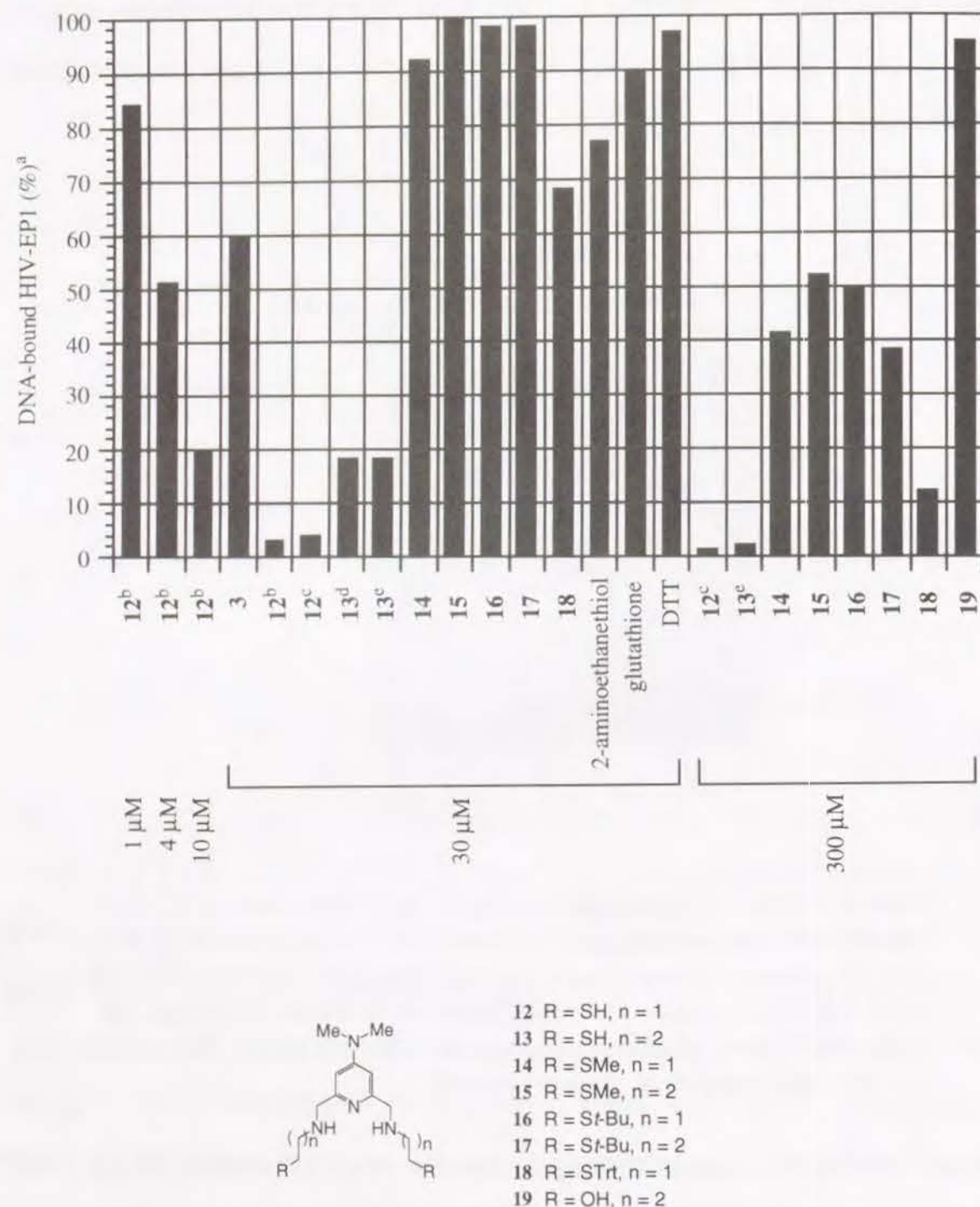


Figure 2-6. Effect of synthetic chelators and mercapto compounds on the DNA binding of HIV-EP1. ^aQuantitation of radioactivity of the electrophoretic band was conducted using an image analyzer. ^bGenerated from 22. ^cGenerated from 20. ^dGenerated from 23. ^eGenerated from 21.

Table 2-1)。

なお亜鉛を加えても回復しなかった理由として、**12**がHIV-EP1から亜鉛をひきぬいた後、さらに加えられた3当量の亜鉛が亜鉛フリーのHIV-EP1の方に結合しないで全部**12**の方に結合してしまった可能性も考えられる。しかし、ゲルシフトアッセイに用いた緩衝溶液中で、**12**に1当量の硫酸亜鉛を加えて亜鉛錯体を形成させた後に2当量の硫酸亜鉛を加えても、さらなる亜鉛の強い取り込みは¹H NMRスペクトル上には観測されなかった。このことは先の可能性を否定する。

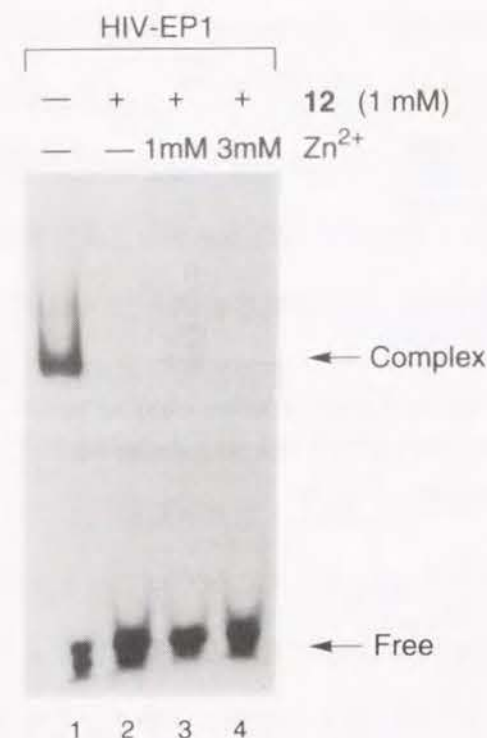


Figure 2-7. Effect of zinc in the inhibition of HIV-EP1 by compound **12** (1 mM) generated from **20**. Zn²⁺ was introduced before (lane 3) or after (lane 4) the addition of HIV-EP1.

これらの予想外の結果は、メルカプト化合物**12**や**13**は**3**とは異なる機構でHIV-EP1-DNAを阻害していることを示している。これまでに亜鉛酵素を阻害する、メルカプト基を持った基質類似体がいくつか知られている⁶⁶⁻⁷²⁾。この中で、阻害剤と酵素の複合体のX線構造解析が行なわれ、阻害剤のメルカプト基が亜鉛酵素の活性部位の亜鉛に結合していることが確かめられているものもある^{66,67)}。この酵素の阻害剤と同様に、化合物**12**や**13**もメルカプト基が亜鉛フィンガー部位（酵素の活性部位と異なり、基質と結合するようにはできてはいないが）の亜鉛に結合すること起因してHIV-EP1-DNAを阻害することが推定できる。

Table 2-1. Effect of zinc in the inhibition of the DNA binding of HIV-EP1 by compounds **12** and **13**.

no.	compound	Zn	DNA-bound HIV-EP1 (%) ^a
1	12 ^d (30 μ M)	-	4
2	12 ^d (30 μ M)	90 μ M ^c	23
3	12 ^d (300 μ M)	-	1
4	12 ^d (300 μ M)	900 μ M ^c	22
5	12 ^d (1.0 mM)	-	0
6	12 ^d (1.0 mM)	1.0 mM ^b	4
7	12 ^d (1.0 mM)	2.0 mM ^c	0
8	12 ^d (1.0 mM)	3.0 mM ^c	2
9	13 ^e (1.0 mM)	-	0
10	13 ^e (1.0 mM)	3.0 mM ^c	12

^aQuantitation of radioactivity of the electrophoretic band was conducted using an image analyzer. ^bZn²⁺ was added before addition of HIV-EP1. ^cZn²⁺ was added after the addition of HIV-EP1. ^dGenerated from **20**. ^eGenerated from **21**.

このように今度はメルカプト化合物を用いて、HIV-EP1-DNAに対する阻害活性をより強めることができた。この阻害の機構ははっきりしないものの、新しい機構を予測させるものであった。メルカプト基に着目したこともまた間違っていなかったと思われる。

また、細胞内ではさまざまな生体反応を制御するために、酸化的雰囲気となったり還元的雰囲気となったりすることがわかってきた⁷³⁾。**2**や**3**は還元的雰囲気下ではメルカプト体として存在するが、酸化的雰囲気下ではそれぞれジスルフィド体**20**、**21**となる。従って、**2**、**3**は還元的雰囲気のみにおいて阻害剤などとしての機能を発揮する、レドックススイッチを持った化合物であることが期待される。なお、ここで合成したメルカプト化合物は金属錯体としても新しく、機能性金属錯体として展開し得ると考えている。

第三章

転写因子阻害における選択性

第一節 序論

前章までに、HIV-1の遺伝子発現に関わるHIV-EP1の機能を、人工配位子によって効率的に阻害することができたことを述べた。遺伝子発現の制御は、実際には複数の転写因子による巧みで協同的な働きによる。エイズの感染者から発病を遅らせたり阻止するためには、まずHIV-1の遺伝子発現調節の分子機構の理解が必要である。そのため、HIV-1の遺伝子発現に関わる転写因子の機構に関して積極的に研究が展開されてきた。その結果、HIV-1のプロウイルスの両末端にあるLTRに、ヒトの宿主細胞が持つ転写因子（AP-1, COUP, NF-AT, USF, TCF-1 α , HIV-EP1, NF- κ B, Sp1, TBPなどが推定される）と HIV-1に由来する転写因子Tatが関与して^{39,40)}遺伝子発現の制御が行なわれることがわかってきた (Figure 3-1)⁴¹⁾。さらに、HIV-1がヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-1)、B型肝炎ウイルス (HBV)、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6)、アデノウイルス (Ad)、サイトメガロウイルス (CMV) など他のウイルスと重感染していると、HIV-1のLTRがそ

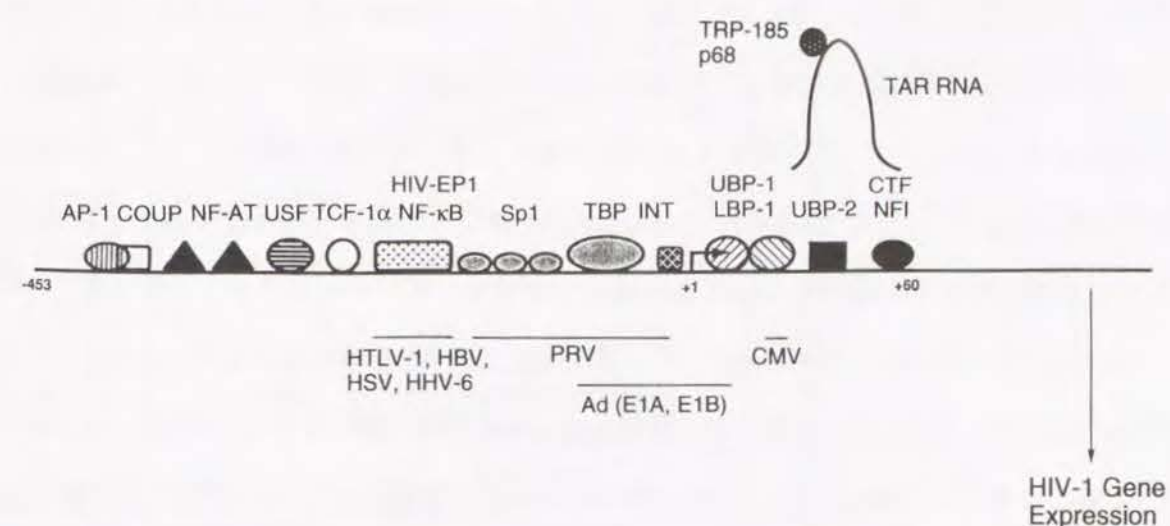


Figure 3-1. HIV-1 LTR binding cellular proteins and viruses which could modulate HIV-1 gene expression.

のウイルスに由来する転写因子の影響を受けて活性化することもわかってきた (Figure 3-1)⁷⁴⁾。すなわち重感染者は、発病までの期間が短くなったりエイズが悪化したりするのである。このようにHIV-1の遺伝子発現調節には多くの転写因子が関与している。

もし特定の転写因子のみの選択的な阻害剤があれば、創薬に加えて、バイオリジカルツールとして用いてこの複雑な遺伝子発現調節の機構解明に役立てることもできる。そこでこのための第一段階として、前章までに創ったHIV-EP1の阻害剤が、HIV-1の遺伝子発現に関わるNF- κ BやアデノウイルスE1Aなどの転写因子との間で選択性を示すかどうかを調べることにした。

第二節 HIV-EP1とNF- κ Bの間における選択的な阻害

1 序論

第一章でも述べたように、NF- κ BはHIV-EP1と同様に κ B配列を認識する転写因子である。NF- κ Bは1986年にSenとBaltimoreにより、免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子に結合する因子としてB細胞から見つけられた²²⁾。その後、多くの分子生物学者がNF- κ Bに取り組んできた。その結果、普遍的な生命現象を理解する糸口ともなる新規な知見が、HIV-EP1についてとは比べものにならない程多く明らかにされてきた。それは例えば、NF- κ Bが異なる遺伝子の産物である2種類のサブユニットp50およびp65から形成していること、p50は前駆体蛋白質p105の分解により生じること、NF- κ Bは非刺激時には阻害蛋白質I κ Bと結合して細胞質に存在しているが、刺激時にI κ Bが不活化され（最近では、リン酸化されたI κ Bがさらに蛋白質分解を受けることにより不活化されとされている⁷⁵⁾）放出されたNF- κ Bが核に移行して転写を活性化すること (Figure 3-2) などである^{24,25,40)}。その機能についても免疫グロブリン、インターロイキン 2受容体⁷⁶⁾、インターロイキン 2、インターロイキン 6⁷⁷⁾、リンホトキシン⁷⁷⁾、腫瘍壊死因子- α ⁷⁷⁾、ヒトインターフェロン β ⁷⁸⁾などの、免疫応答に必須である多様な遺伝子の発現に関与することが明らかとなってきた²³⁾。HIV-1遺伝子の発現に関しては、NF- κ Bが*in vitro*でHIV-1遺伝子の転写を活性化することが示された^{79,80)}。また、HIV-1の増殖に関わることが知られるHIV-1 Nef蛋白質がNF- κ Bの制御を行なうことも示されている⁸¹⁾。なお、NF- κ Bの関連蛋白質c-relやp49によるHIV-1遺伝子の

活性化については報告がある^{36,37,82)}。

このように、NF- κ BもHIV-EP1と同様にHIV-1遺伝子を活性化することが示された。生体内にある実際の細胞中では、ホルボールエステルなどによる刺激によってHIV-EP1とNF- κ Bの両方が同一の細胞内に相前後して誘導されると考えられる (Figure 3-2)^{24,30,32)}。すなわち、NF- κ BはI κ Bとの複合体として既に細胞質に存在しているので刺激によりすぐに核に移行するが、HIV-EP1は刺激により転写、翻訳されて生成するためNF- κ Bよりも遅れて誘導されると予想される。そこでそれぞれの転写因子による活性化機能をより正確に、また詳細に調べるためには、2つの転写因子の選択的な阻害剤が必要となる。

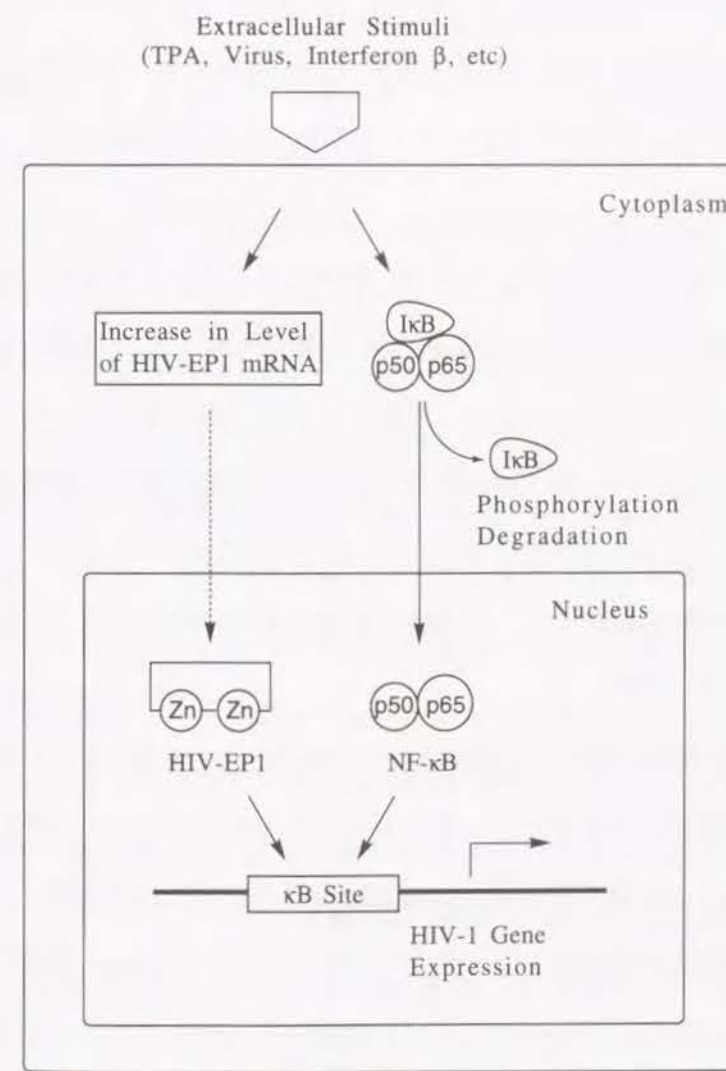


Figure 3-2. Induction of HIV-EP1 and NF- κ B by extracellular stimuli

HIV-EP1やNF- κ B以外にも κ B配列を認識する転写因子は知られているが、これまでに報告されたものはDNA認識部位として亜鉛フィンガードメインを持つHIV-EP1型とRelホモロジードメインを持つNF- κ B型に分類することができる。また最近、HIV-EP1に類似した亜鉛フィンガー蛋白質*schnurri*が、2つのグループによってショウジョウバエから単離された^{83,84}。*schnurri*は、ショウジョウバエの発生に参与するサイトカインdppのシグナル伝達の下流に存在することが示された。従って*schnurri*は、転写因子としてdpp応答遺伝子の発現に参与していることが予想される。また、ショウジョウバエの発生に参与する別の転写因子としては、NF- κ Bの類似蛋白質である*dorsal*が知られていた⁸⁵⁻⁸⁷（ショウジョウバエの背腹の軸を決定するのに重要な役割を果たすことが知られている）。すなわちショウジョウバエの発生に参与する転写因子としても、HIV-EP1型とNF- κ B型が存在することが明らかにされてきたのである。この2つの型の転写因子による遺伝子制御は、もっと広く生物界に存在するのかも知れない。この点からもこの2つのタイプの転写因子の選択的な阻害剤はバイオロジカルツールとして広く使える可能性もあり、この創製は意義深いと考えている。

先に述べたようにNF- κ Bの構成ユニット、細胞中での挙動、機能などに関して多くのことがわかってきている。これに対して、NF- κ Bおよびその類似蛋白質（Relホモロジー蛋白質）がどのようにDNAを認識しているのかということについては、亜鉛フィンガー蛋白質についてと異なり、長い間明らかにされて来なかった。NF- κ BのDNA認識において、亜鉛の関与が提唱されたこともある⁸⁸。その後、フォトクロスリンキング法により、NF- κ B (p50)₂ (p50のホモダイマー、ヘテロダイマーと同様にDNAの κ B配列を認識する) がDNAを認識する際のDNAの近くに存在する (p50)₂ のアミノ酸の位置が決定された^{89,90}。

ようやく1995年になって (p50)₂ とDNAの錯体のX線結晶解析が報告され、Relホモロジードメインの実体が初めて明らかにされた^{91,92}。すなわち、このドメインは免疫グロブリンのそれと似た2つの β -バレルドメインから成る。N末端のドメインは塩基配列特異的にDNAを認識し、C末端のドメインは二量化や阻害蛋白質I κ Bの認識を行なう。どちらのドメインもDNAと接触し、逆平行 β シートを合わせて5つ使ってDNAのメジャーグループを認識する。ホモダイマー全体では4つのドメインがDNAと結合しており、DNAを取り囲むようになっている。そしてそこには亜鉛の関与はないことがわかった。DNA結合蛋白質には、亜鉛フィンガー蛋白質のほかにヘリッ

クス-ターン-ヘリックス、ロイシンジッパー、bジップなどが知られている⁴¹が、NF- κ Bはこれらの種類のどれにも属さない。このように、HIV-EP1の持つ亜鉛フィンガードメインとNF- κ Bの持つRelホモロジードメインは全く異なることがわかった。

2 阻害活性

前章までに合成したHIV-EP1-DNAの阻害剤は、NF- κ BとDNAの結合を阻害するかどうかを検討した。以前、*o*-フェナントロリン (2 mM) や亜鉛 (1.5または2 mM) によって、NF- κ BとDNAの結合が阻害されることがBaeuerleらによって示された⁸⁸。そこで化合物3、5-7およびその亜鉛錯体のNF- κ B-DNA結合に対する阻害活性を、*o*-フェナントロリンや硫酸亜鉛の阻害活性とともにゲルシフトアッセイにより調べた。なお、先に述べたようにNF- κ Bは2種類のサブユニットp50とp65のヘテロダイマーであるが、それぞれのホモダイマー[(p50)₂および(p65)₂]もDNAの κ B配列に結合する⁹³。細胞中でのこれらのホモダイマーの役割は明確にされていないが、阻害に関してより詳細な知見を得るために、まず単純であるそれぞれのホモダイマーを用いてアッセイを行なった。DNAとしてはHIV-EP1についての実験と同様に、マウス κ 軽鎖のエンハンサーの κ B配列を含む二本鎖オリゴヌクレオチドを用いた。アッセイ法は第一章に記載した方法に従い、HIV-EP1の代わりに(p50)₂または(p65)₂を用いて行なった。結果をFigure 3-3、3-4に示す。

(p50)₂とDNAの結合は、1 mMの3、3-Zn、5、5-Zn、*o*-フェナントロリン、硫酸亜鉛によって阻害されなかった。これに対して、カルボキシル基を持つ6、6-Zn、7、7-Znには1 mMにおいて阻害が見られた。また(p50)₂にDNAを結合させた後に7-Znを加えても、その阻害効果にはほとんど変化が見られなかった。[なお、6の鏡像体(RR体)の亜鉛錯体(RR-6-Zn)も、6-Znより少し強い阻害効果を示した [DNA-bound (p50)₂: 63% (0.5 mM 6-Zn); 48% (0.5 mM 7-Zn); 28% (0.5 mM RR-6-Zn)]。] (p65)₂とDNAの結合に対しても、同じような阻害効果が見られた。すなわち、1 mMの3、3-Zn、5、5-Zn、*o*-フェナントロリン、硫酸亜鉛によって阻害されなかったが、1 mMのカルボキシル基を持つ6、6-Zn、7、7-Znによって阻害された。

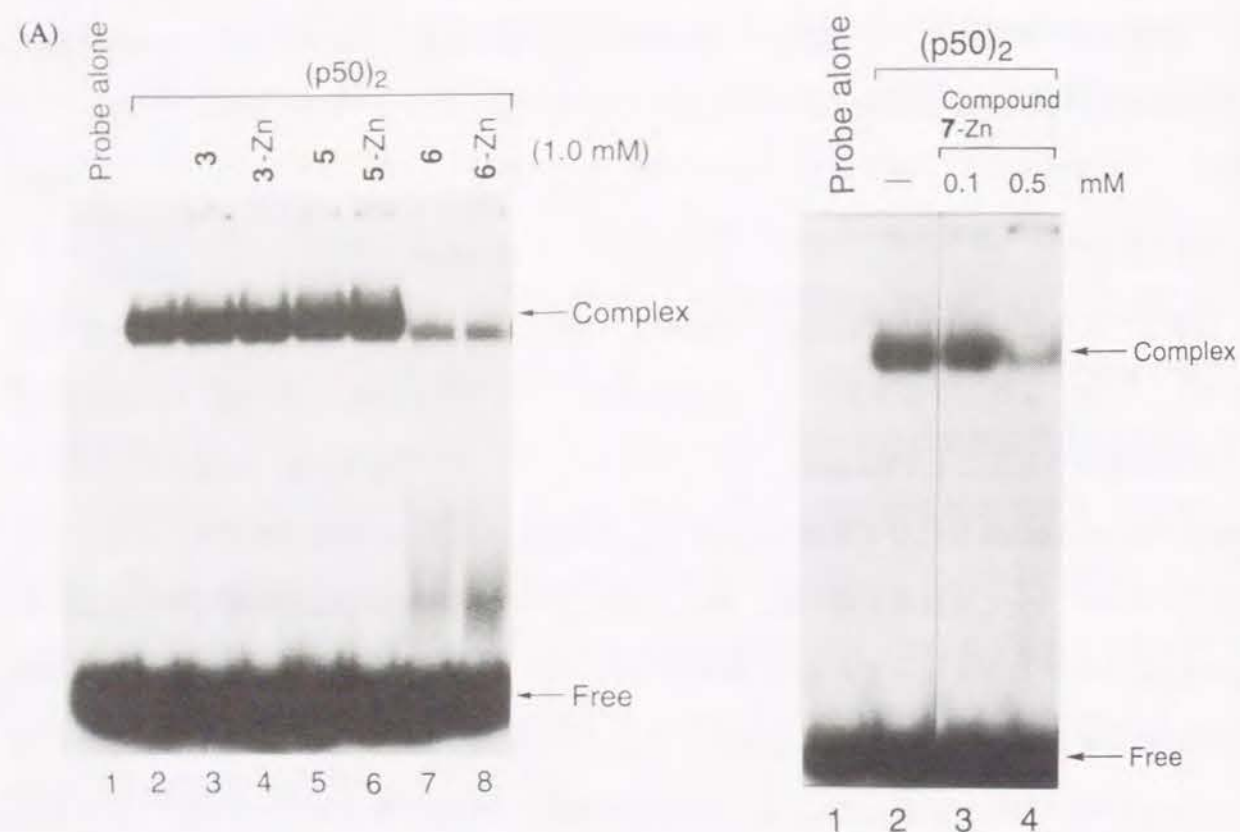


Figure 3-3. Effect of synthetic compounds on the DNA binding of (p50)₂ or (p65)₂. After homodimer (p50)₂ or (p65)₂ was incubated with each compound in the presence of poly(dI-dC), a radioactive DNA probe containing a κ B site from the mouse κ light-chain enhancer was added. Sample was loaded onto a polyacrylamide band shift gel, and the gel electrophoresis was run. (A) Inhibition of DNA binding of (p50)₂. (B) Inhibition of DNA binding of (p65)₂.

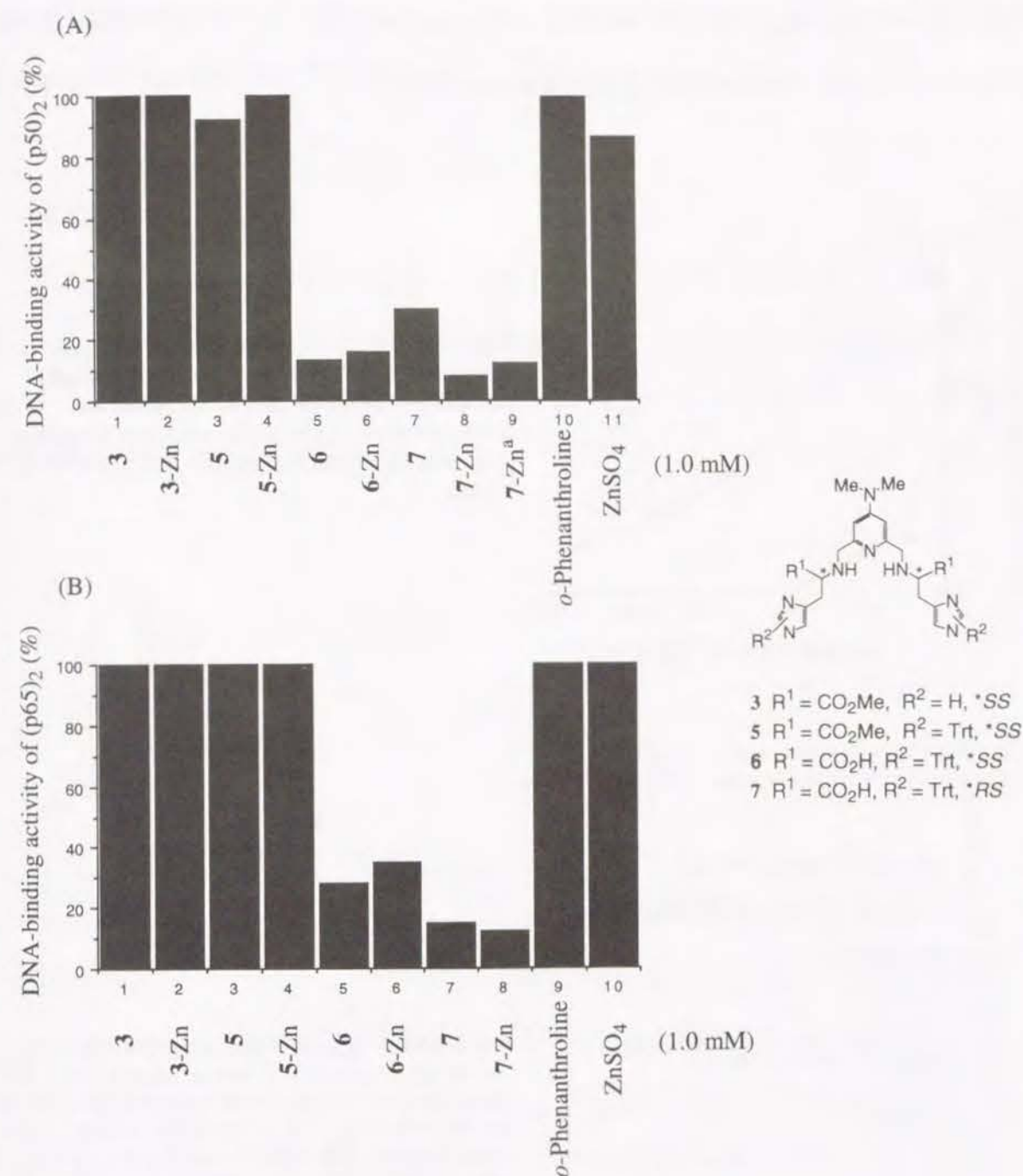


Figure 3-4. Effect of synthetic compounds, *o*-phenanthroline, and ZnSO₄ on the DNA binding of (p50)₂ or (p65)₂. Quantitation of radioactivity of the electrophoretic band was conducted using an image analyzer. (A) Histogram of the inhibition of DNA binding of (p50)₂. ^aColumn 9 shows the results of a reaction in which 7-Zn was added after (p50)₂ was bound to the DNA probe. (B) Histogram of the inhibition of DNA binding of (p65)₂.

また、7-Znによる(p50)₂-DNAの阻害においては濃度依存性が見られた (Figure 3-5)。7-ZnのIC₅₀は室温、30分間のインキュベーションによつては~500 μMであったが、37 °Cで8時間インキュベートしたところIC₅₀は10 μM以下に下がった (Figure 3-5)。

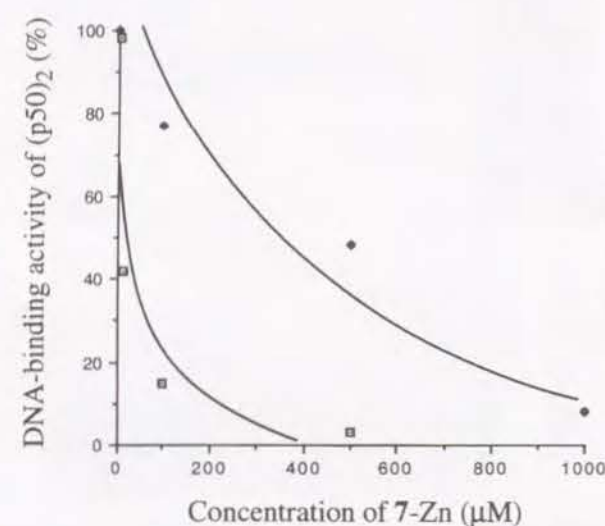


Figure 3-5. Dose dependence of the inhibition of DNA binding of (p50)₂ by 7-Zn. Quantitation of radioactivity of the electrophoretic band was conducted by use of an image analyzer. Condition of incubation: room temperature, 0.5 h (●), 37 °C, 8 h (□).



Figure 3-6. Effect of 7-Zn on the DNA binding of NF-κB. After NF-κB was incubated with 7-Zn in the presence of poly(dI-dC), a radioactive DNA probe containing a κB site from the mouse κ light-chain enhancer was added. Sample was loaded onto a polyacrylamide band shift gel, and the gel electrophoresis was run.

次にJurkat T細胞の核抽出物中のNF-κB (p50とp65のヘテロダイマー) とDNAの結合に対する7-Zn (1 mM) の阻害効果を同様にゲルシフトアッセイにより調べたところ、確かに阻害が見られた (Figure 3-6, DNA bound NF-κB: 47%)。

3 考察

このようにHIV-EP1-DNA結合を阻害した亜鉛配位子3、5はNF-κB-DNA結合を阻害しなかった。一方、意外なことにHIV-EP1-DNA結合を阻害しなかった6-Zn、7-ZnがNF-κB-DNA結合を阻害した。結局、κB配列を認識する2つの転写因子HIV-EP1とNF-κBの機能をそれぞれ選択的に阻害することができた (Figure 3-7)。

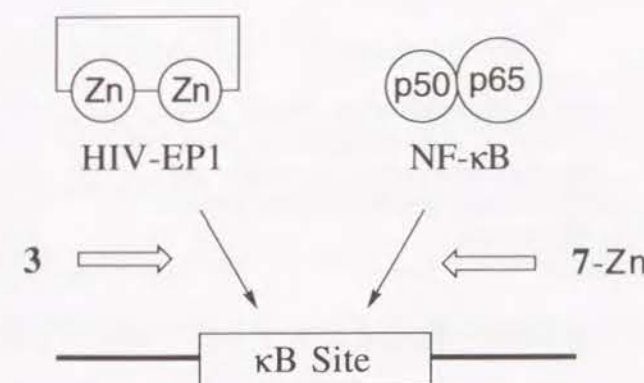


Figure 3-7. Discriminative inhibition of κB site binding of HIV-EP1 and NF-κB.

この6-Zn、7-Znおよび亜鉛フリーの6、7はどのような機構でNF-κBとDNAの結合を阻害するのかという点に関して少しでも知見を得るために、7-ZnがNF-κBとその阻害蛋白質IκBの結合を阻害するかどうかを調べた。実験は³⁵S-メチオニンでラベルしたIκB-αとセファロース粒子に固定したp50またはp65 (p50ビーズまたはp65ビーズ) ⁹³⁾を用いた共沈降法により行なった。すなわち、p50ビーズ (またはp65ビーズ) と7-Znを室温で40分間インキュベートした後にIκB-αを加え、p50ビーズ (またはp65ビーズ) に結合しなかったIκB-αは緩衝液で洗浄することにより除去した。結合したIκB-αの量をSDS-PAGEにより分離した後に検出し、その放射活性量を調べた。結果をFigure 3-8に示す。

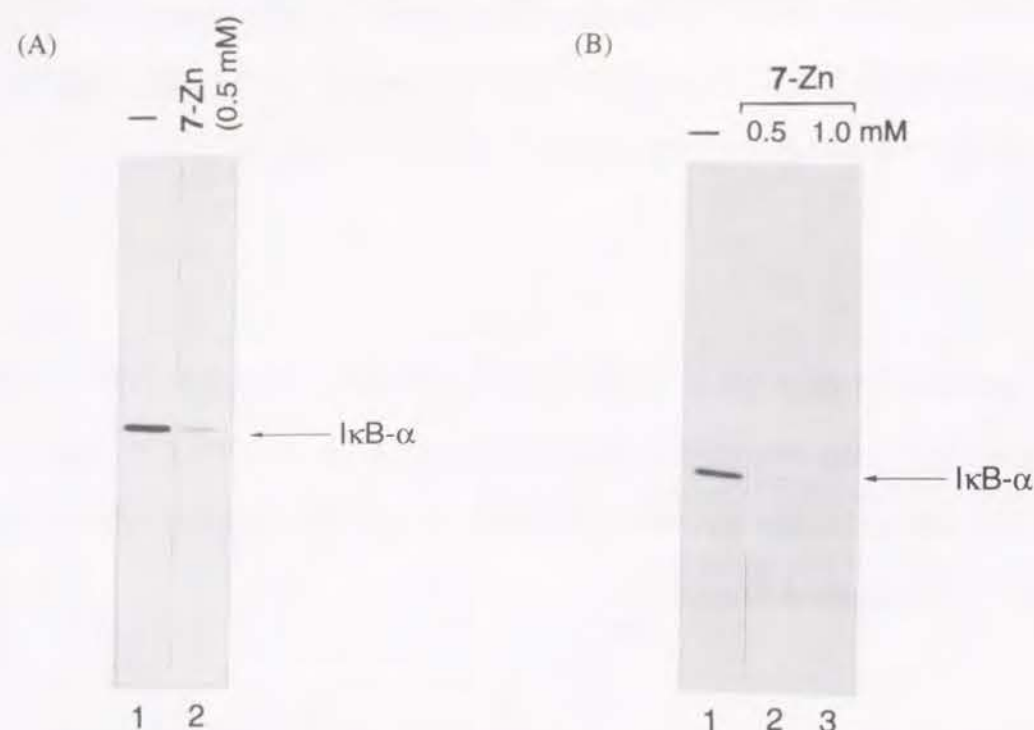


Figure 3-8. Effect of 7-Zn on IκB-α binding of p50 beads or p65 beads. After incubation of p50-beads or p65-beads with 7-Zn, the radioactive IκB-α probe was added and further incubated. The beads were washed with binding buffer, and SDS-PAGE was run. (A) Inhibition of IκB-α binding of p50 beads by 7-Zn. (B) Inhibition of IκB-α binding of p65 beads by 7-Zn.

これより、明らかに7-Znはp50またはp65と、IκB-αの結合を阻害することがわかった [IκB-α-bound p50: 33% (0.5 mM 7-Zn), IκB-α-bound p65: 31% (0.5 mM 7-Zn), IκB-α-bound p65: 16% (1.0 mM 7-Zn)]。なお、これらの結合の、1.0 mMの3, 3-Zn、5, 5-Zn、硫酸亜鉛による明確な阻害は見られなかった。また、p50ビーズとDNAの結合も7-Znによって阻害され、3, 3-Zn、5, 5-Znによっては阻害されないことをこのような共沈法を用いて確認した [DNA-bound p50: 20% (3.0 mM 7-Zn), 9% (4.0 mM 7-Zn)]。このことから7-ZnはNF-κBの方に何らかの作用を及ぼして、そのDNAとの結合を阻害すると推定できる。

また、先に述べたように(p50)₂と7-ZnをインキュベートしてからDNAを加えても、また(p50)₂にDNAを結合させた後に7-Znを加えても阻害効果に変化が見られなかったことから、7-Znは(p50)₂のDNA結合ドメインに作用しているのではないと予測できる。(前章までに述べたようにHIV-EPI-DNA結合の阻害においては、HIV-EPIにDNAを結合させた後に阻害剤を加えると阻害効果が弱まった。これは、阻害剤がDNA結合ドメインである亜鉛フィンガー部位に作用する

ためと考えられる。) 7-Znは(p50)₂や(p65)₂とDNAの結合を阻害するがHIV-EPIとDNAの結合を阻害しない。また、(p50)₂は(p65)₂よりもDNAに対して10倍程度強く結合し³⁷⁾、結合様式の違いを予想させるが、これらの蛋白質はRelホモロジー領域を共通に持つ^{24,25,40)}。これらから、詳細な機構ははっきりしないものの、7-ZnはNF-κBのRelホモロジー領域に作用している可能性が高い。

これまでに、HIV-EPIが阻害剤の標的として着目されたのは前章までの研究においてが初めてであるが、NF-κBの機能を阻害する化合物はいくつか示されてきた。刺激された細胞中でのNF-κBの活性化を阻害するものとしては、リボ酸⁹⁴⁾、ビタミンE誘導体⁹⁵⁾、メルカプト化合物⁹⁶⁻⁹⁸⁾などの抗酸化剤、キサンチン誘導体^{99,100)}、プロテインキナーゼC阻害剤¹⁰⁰⁾、サリチル酸やアスピリン(緒論で記載)⁷⁾などがある。また、NF-κB p65のアンチセンス化合物¹⁰¹⁾も知られている。

NF-κBに直接作用してそのDNA結合能を阻害するものには、先に述べた*o*-フェナントロリンがある⁸⁸⁾。すなわち精製したNF-κB (p50とp65のヘテロダイマー) とDNAの結合が2 mMの*o*-フェナントロリンによって阻害され、亜鉛を加えると回復することが示された。これは、NF-κBとDNAの結合に亜鉛が関与しており、その亜鉛が*o*-フェナントロリンによって除去されたためと考えられた⁸⁸⁾。しかしその後、前述したように、X線結晶解析によりNF-κBの持つRelホモロジドメインとDNAの結合に亜鉛が関与していないことが示された^{91,92)}。この*o*-フェナントロリンによる阻害は、p50とp65のヘテロダイマー結合に亜鉛が関与してそれが除去されることによる可能性があるが、詳細は明らかでない。

またこれも阻害の機構は不明であるが、精製したNF-κBとDNAの結合が、1.5 mMの亜鉛によっても阻害されることがBaeuerleらにより示されている⁸⁸⁾。なお、1.0 mMの金属 (ZnSO₄, CuCl₂, MnCl₂, FeCl₃, CoCl₂, NiCl₂, CdCl₂) がNF-κB (p50)₂とDNAの結合を阻害するかどうかについて、先に述べた方法でゲルシフトアッセイを行ない調べた。その結果、これらの金属の中でCuCl₂とFeCl₃が明らかな阻害効果を持つことがわかった [DNA bound (p50)₂: 0% (CuCl₂); 24% (FeCl₃)]。この阻害は、これらの金属の酸化作用によると考えられる。すなわち、NF-κBとDNAが結合するためにはNF-κBが還元型になることが必要であることが示されている⁸¹⁰²⁾、CuCl₂やFeCl₃によって(p50)₂の還元型が保たれなくなるためにDNAと結合できなくなったと推定している。さらに7-Cu (7の銅錯体) や7-Zn,Cu [7にZnCl₂とCuCl₂を1当量ずつ加えてできた。7-Znや7-Cuとも異

なるTLC上のR_f値を持ち、7-Cuと異なるUV、ESRスペクトルを示した。これらや高分解能質量分析[HRMS (FAB). calcd for C₅₉H₃₄O₄N₈CuZn: 1165.2855. found: 1165.2867.] から二核錯体と推定できる。] も阻害効果を示した [DNA-bound (p50)₂: 48% (0.5 mM 7-Zn); 44% (0.5 mM 7-Cu); 28% (0.5 mM 7-Zn,Cu)]。

そのほかにNF-κBに直接作用する阻害剤はほとんど知られておらず、7-ZnはNF-κBの新しい阻害剤であるといえる。

HIV-1のLTRに存在するκB配列を認識する転写因子として最も良く研究されてきたものがNF-κBであるため、NF-κBの阻害剤がHIV-1遺伝子発現を阻害するかどうかについてもいくつか検討されてきた。先に述べたNF-κBの機能を阻害する化合物の中で、HIV-1のLTRからの遺伝子発現を阻害したり^{7,96,97,99,100)}、感染細胞におけるHIVの複製を阻害する^{96,103)}ことが示されたものがある。NF-κBのような宿主細胞が持つ転写因子を標的とする阻害剤をエイズの治療薬として考えた場合、耐性ウイルスの出現がないという点では有望である反面、毒性が問題となるであろう。しかし、NF-κBの機能を阻害するキサンチン誘導体であるペントキシフィリン (PTX) をTatの阻害剤Ro 24-7429 (緒論で記載) と共に使用すれば、毒性の見られない少量のPTXでHIV-1のLTRからの遺伝子発現の阻害効果が挙がることも示されている¹⁰⁴⁾。さらに、サリチル酸やアスピリンについては、詳細なデータは不明なもの実際に患者に投与して効果が見られたとの報告もある¹⁰⁵⁾。これらのことから、7-ZnのようなNF-κBの阻害剤はエイズの治療薬へと発展できる可能性を十分に持っているであろう。

第三節 HIV-EP1とE1Aの間における選択的な阻害

1 序論

先にも述べたように、ある遺伝子が発現するためには、多くの転写因子の巧みで協同的な働きが必要である。この転写制御機構について研究が最も進んでいるのは、DNAウイルスに関しである。すなわち、ウイルス遺伝子が実験的に扱いやすいこと、アデノウイルスなどのDNAウイルスについては全塩基配列や遺伝子産物が詳細に解明されていることなどから、DNAウイ

ルスの転写制御機構がモデルとなることで、広く細胞遺伝子に関しても理解された。そのDNAウイルスの中でもアデノウイルスについては非常に良く研究され、転写制御の機構についても多くのことが明らかにされてきている⁴⁰⁾。

アデノウイルス感染後に、最初に宿主細胞内で発見されるウイルス由来の蛋白質はE1Aである^{106,107)}。この蛋白質の存在は古く1970年代から知られており、その後に転写因子としての働きが次々とわかってきた。E1Aには、RNAスプライシングにより生じた、それぞれ243アミノ酸、289アミノ酸をコードした2種類の12Sと13Sがある¹⁰⁸⁾。E1Aは宿主細胞内で発現後、ほかのウイルス遺伝子の転写を活性化する¹⁰⁶⁾。E1Aは、DNAに対する結合力は弱く¹⁰⁶⁾、HIV-EP1やNF-κBとは異なって多種類の蛋白質を認識することで転写因子として働く。E1Aの関わる転写活性化機構は複雑で、これまでに3つの機構が明らかにされてきた。すなわち、(1) 宿主細胞が持つ複数の転写因子と同時に結合してアダプターとして働くことで転写を活性化する場合、(2) 転写因子を活性化する酵素を活性化する場合、(3) 転写因子と抑制因子が複合体を形成して非活性型になっているところに、抑制因子と結合して取り除くことで転写を活性化する場合である²⁶⁾。機構(3)の例として、E1Aは転写因子E2Fの抑制因子Rbと結合するために、E2Fが活性型となりその支配下にある遺伝子群が発現されることが挙げられる¹¹⁰⁾。このことが原因の1つとなって、E1Aは細胞を癌化すると考えられている。

E1Aが関わるHIV-1遺伝子の発現に関しては、機構(1)と考えられる転写活性化が知られる (Figure 3-9)。すなわち、HIV-1とアデノウイルスが重感染すると、アデノウイルスの影響でHIV-1遺伝子発現が活性化する。これには、アデノウイルスの転写因子の中で、E1A 12Sは関与しないもののE1A 13Sが関与することがCATアッセイ法により示された¹¹¹⁾。その後12Sではなく13Sに存在する46アミノ酸領域 (CR3, Figure 3-10) は、宿主細胞に存在する転写基本因子TFIIDの1つの構成成分であるTATA結合蛋白質 (TBP) と結合することがわかった^{112,113)} (Figure 3-9)。

(転写基本因子とは多くの遺伝子の発現に共通の因子をいう。これに対してHIV-EP1、NF-κB、E1Aのようにそれぞれの遺伝子の発現に特異的に作用する因子を転写調節因子という。) 一方HIV-1のLTRにはTATA配列 (5'-TATA-3') が存在し、E1Aが関わるHIV-1遺伝子の発現にはTATA配列が必要であることが明らかにされた^{37,114)}。またさらに、TATA配列にはTBPが結合し¹¹⁵⁻¹¹⁷⁾、TBPがHIV-1遺伝子の発現に必要であることもわかった³⁷⁾。すなわちアデノウイルスE1A

はCR3に存在するドメインを用い、TATA配列を認識するTBPと結合することでHIV-1遺伝子発現を活性化すると考えられる。この際、おそらくE1Aの別のドメインが、別の転写調節因子Xと結合してE1Aがアダプターとして働くと考えられる (Figure 3-9)。なお、おもしろいことにE1A 12SはHIV-1遺伝子発現を抑制する逆の効果を持つことが示されている¹¹⁸⁾。

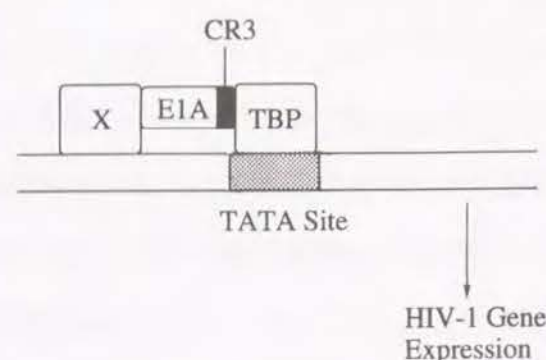


Figure 3-9. Activation of HIV-1 gene expression by E1A.

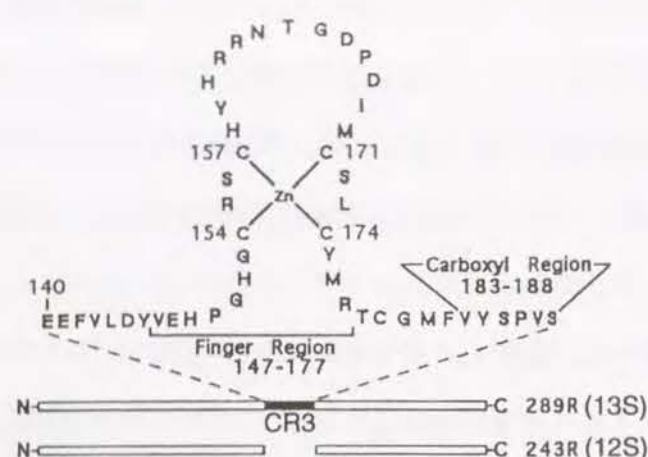


Figure 3-10. TBP binding domain of E1A.

E1A 13SのCR3に存在するTBP認識ドメインについては、当初はカルボン酸領域 (Figure 3-10)とも予想されていた¹¹²⁾。しかし、その後CR3領域を含む49個のアミノ酸のそれぞれに変異を導入し、そのTBP結合能が免疫沈降法により詳細に調べられた¹¹⁹⁾。その結果、既にCR3における存在が知られていた¹²⁰⁾C₄型亜鉛フィンガー (Figure 3-10) 内における7つのアミノ酸に変異を導入した場合に、*in vivo*における活性化能¹²¹⁾とともにTBP結合能が顕著に減少した。これに対してカルボン酸領域に変異を導入した場合には、TBP結合能の減少がほとんど見られなかった。このことからTBP認識ドメインは亜鉛フィンガーであり、またこの認識によって活性化が行なわれることが明らかとなった。なおTBP側の結合部位は、塩基性アミノ酸に富むC末端51アミノ酸残基

と考えられている^{112,122)}。

2 阻害活性

前章までに合成したHIV-EPI-DNA結合の阻害剤は、亜鉛を引き抜いてE1AとTBPの結合をも阻害する可能性が考えられた。そこでE1A-TBP結合の阻害活性を、TBPビーズを用いる共沈降法により調べることにした。E1A (E1A 13S) としては³⁵S-メチオニンでラベルしたもの (*in vitro* 転写および翻訳により合成する) を用いることもできたが、比較のために、これまでに使用してきたHIV-EPIやNF- κ Bと同様に大腸菌を用いて発現させたものを用いることにした。

大腸菌を用いて発現させたE1AとTBPビーズを用いた共沈降実験の例は知られていない。またE1Aはセファロース自身に吸着しやすい性質を持つため、TBPビーズに結合しセファロースには吸着しないようにまず緩衝溶液などの条件を検討した結果、次のようなアッセイ手順を確立した。すなわちE1Aと阻害剤を室温で30分間インキュベートした後に、TBPビーズを加え5℃で1時間インキュベートする。TBPビーズに結合しなかったE1Aは、緩衝溶液で洗浄することにより除去する。結合したE1AをSDS-PAGEを行なって分離した後に、ウエスタンブロットにより検出し、そのバンドの濃さをデンストメーターにより調べる。なおこの実験を行なう際には、常にTBPビーズの代わりにグルタチオンセファロースを用いたコントロール実験を行ない、E1Aがセファロースに吸着しないことを確かめる。これにより行なった実験結果をFigure 3-11, Table 3-1に示す。

どの化合物もE1AとTBPの結合を阻害するためには、非常な高濃度を必要とした。すなわち、10 mMの3によっては半分程度の結合が阻害され、100 mMの3を用いることでほとんどの結合が阻害された。阻害活性を50 mMで比較すると、エステルを持たない8よりも3の方が少し高く、さらにヒドロキシル基を持つ19の方が少し高かった。また、EDTAは50 mMで阻害活性を示さなかった。なお、メルカプト化合物12や13はこのレベルの濃度では水に溶けないため、阻害活性を測定することはできなかった。また50 mMのジメチルアミノ化合物10が存在すると、E1Aがセファロース自身に吸着するため、阻害活性を測定できないこともわかった。

次に、阻害されたE1AとTBPの結合が、亜鉛を加えることにより回復するかどうかを調べた。

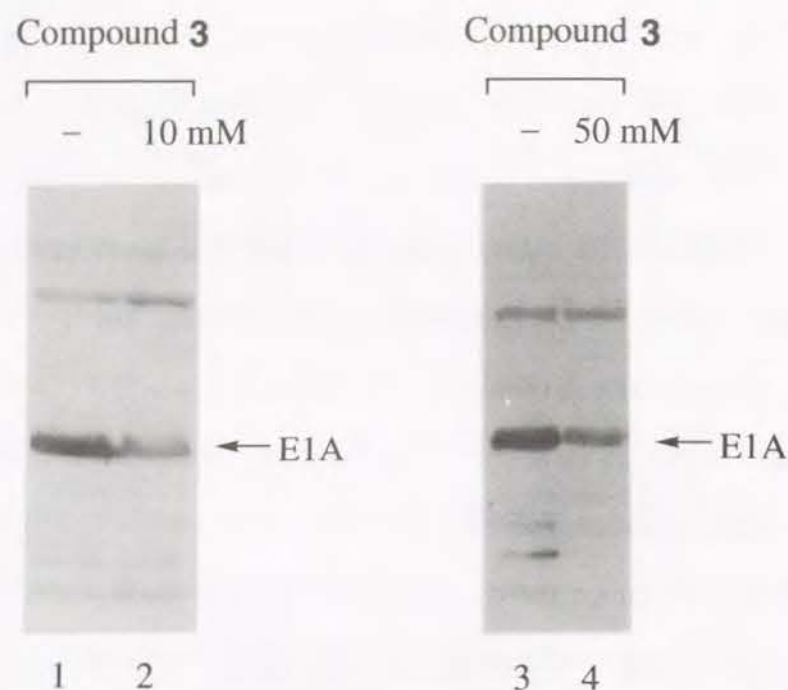
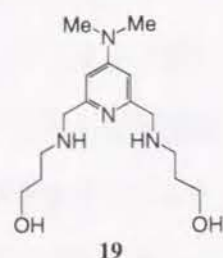
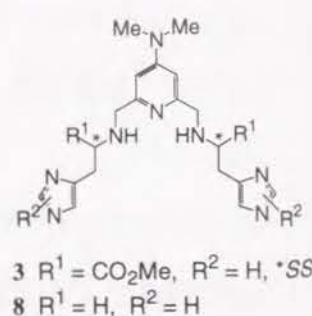


Figure 3-11. Effect of **3** on TBP binding of E1A. After incubation of E1A with **3**, TBP-beads was added and further incubated. The beads were washed with buffer, and SDS-PAGE was run.

Table 3-1. Effect of synthetic chelators and EDTA on the TBP binding of E1A.

no.	compound	TBP-bound E1A (%) ^a
1	3 (10 mM)	43
2	3 (50 mM)	30
3	3 (100 mM)	12
4	8 (50 mM)	41
5	19 (50 mM)	25
6	EDTA (50 mM)	100

^aQuantitation of radioactivity of the electrophoretic band was conducted using a densitometer.



まず、先に確立した手順でE1Aと阻害剤のインキュベーション、さらにTBPビーズとのインキュベーションを行なった後に亜鉛を加えた。その結果、亜鉛が存在するとE1Aがセファロース自身に吸着するため、TBPに結合したE1Aの量を測定することができないことがわかった。そこでE1Aと阻害剤を室温で30分間インキュベートしてから亜鉛を加え、さらに室温で5分間インキュベートした後にショートカラムをかけることにした。カラムによって亜鉛や阻害剤など小分子化合物が除かれて得られたE1Aと、TBPビーズを5℃で1時間インキュベートし、その後TBPに結合したE1Aの量を先に述べた手順に従って測定した。実験結果をTable 3-2に示す。

Table 3-2. Effect of zinc in the inhibition of the TBP binding of E1A by compounds **3** and **19**.

no.	compound	Zn ²⁺	TBP-bound E1A (%) ^a
1	3 (50 mM)	-	22
2	3 (50 mM)	+ (10 mM)	100
3	19 (50 mM)	-	66
4	19 (50 mM)	+ (10 mM)	42

^aQuantitation of radioactivity of the electrophoretic band was conducted using a densitometer.

その結果、**3**によって阻害されたE1AのTBPとの結合は亜鉛を加えると回復したのに対して、**19**によって阻害されたE1AのTBPとの結合は亜鉛を加えても回復しなかった。

3 考察

前章までに述べたように、HIV-EP1とDNAの結合のほとんどは、300 μMのイミダゾール配位子**3**や**8**によって阻害された。またヒドロキシル化合物**19**は10 mMで、結合の多くを阻害した (DNA bound HIV-EP1: 29%)。これに比べてE1AとTBPの結合を阻害するためには高濃度の阻害剤を必要とし、300 μMの**3**によってはほとんど阻害されなかった。E1A-TBP結合の阻害されにくさがE1AやTBPの蛋白質に含まれる不純物などの影響による可能性もあるため、E1Aおよび

TBPの存在下で3によるHIV-EP1-DNA結合の阻害を試みた。その結果、E1AおよびTBPが存在しなくても、HIV-EP1-DNA結合の阻害効果に変化が見られなかった。このことから、E1A-TBP結合の阻害されにくさは不純物の影響ではなく、本質的なものであると考えられる。従って、2つの亜鉛フィンガー蛋白質HIV-EP1とE1Aの間においても、HIV-EP1の機能を選択的に阻害することができたといえる。

この高濃度の阻害剤によるE1A-TBP結合の阻害の機構については次のように考えられる。イミダゾール配位子3による阻害反応の後に亜鉛を加えると、E1A-TBP結合の回復が見られた。従ってHIV-EP1-DNAの阻害と同様に、この阻害は3がE1Aの亜鉛フィンガーから亜鉛を除去したことによると考えられる。また、E1Aと阻害剤をインキュベートした後にカラムをかけなかった場合の阻害効果 (TBP-bound E1A: 30%) が、カラムをかけることで弱まることはなかった (TBP-bound E1A: 22%)。この事実は、阻害が亜鉛の除去に起因することと一致している (Figure 3-12)。

同じ亜鉛フィンガー蛋白質の間で、HIV-EP1よりもE1Aの方が3による阻害を受けにくかったことの要因として、HIV-EP1がC₂H₂型亜鉛フィンガーを持つのにに対して、E1Aは亜鉛が4つのシステインに結合したC₄型亜鉛フィンガー (Figure 3-10) を持つことが考えられる。おそらく、C₄型亜鉛フィンガーの亜鉛は、C₂H₂型のそれよりも強くフィンガー内に取り込まれているのであろう。

これに対して、ヒドロキシル化合物19による阻害反応の後に亜鉛を加えても、E1A-TBP結合は回復しなかった。これは、メルカプト化合物12、13によるHIV-EP1-DNAの阻害と同様に、19のヒドロキシル基がE1Aの亜鉛フィンガー部位の亜鉛に結合したためとも考えられる。実際、E1Aと阻害剤をインキュベートした後にカラムをかけなかった場合の阻害効果 (TBP-bound E1A: 25%) はカラムをかけることで弱まった (TBP-bound E1A: 66%)。これは、カラムをかけた後にE1Aに結合した19 (E1A-19) から19が脱離したことと一致している (Figure 3-12)。このように、19による阻害の機構ははっきりしないものの、亜鉛の除去とは異なる機構が示されている。

第一章でも述べたように、HIV-EP1-DNA結合に対しては19よりも3の方がかなり強い阻害効果を示した。これとは異なり、E1A-TBP結合に対しては高濃度においてはああるが、3よりも19の方がやや強い阻害効果を示した。このヒドロキシル化合物19をもとにすれば、HIV-EP1-DNA

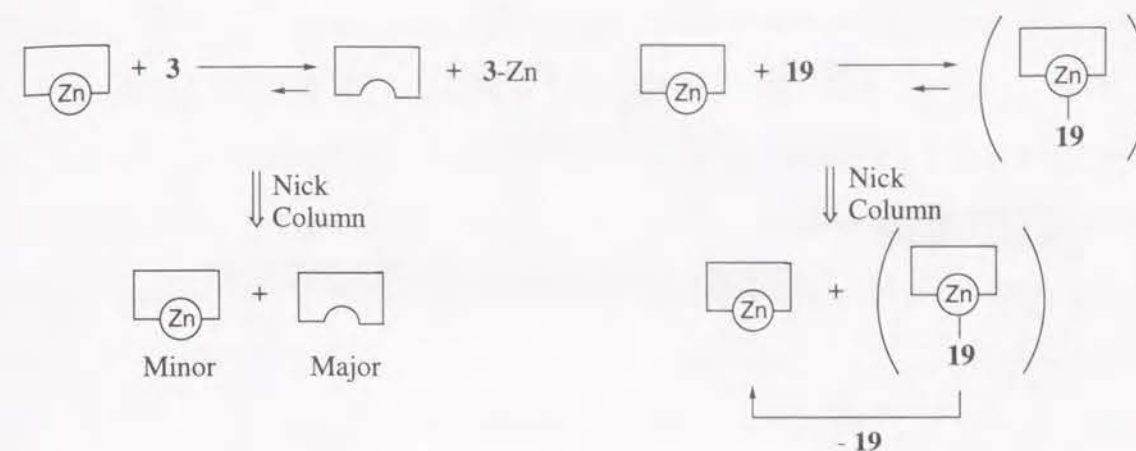


Figure 3-12. Differences on the effect of Nick column between the inhibition by 3 and by 19.

結合よりもE1A-TBP結合を強く阻害する化合物ができることが期待できる。

また先にも述べたように、E1Aは複数の認識ドメインを用いた多様な機能を持つ。HIV-1遺伝子発現の制御に関しても、亜鉛フィンガーを持つE1A 13Sが活性化に関与し、E1A 12Sが抑制に関与することが示されている¹¹⁸⁾。従って、E1A 13Sの亜鉛フィンガードメインのみを阻害する化合物を創ることができれば、E1Aの複雑な遺伝子制御機構を明らかにするためのバイオロジカルツールとしても有用であると考えている。

第四節 考察

このように第一章、第二章においては、亜鉛フィンガー部位の亜鉛を標的とした分子設計によって、HIV-1遺伝子発現に関わる転写因子HIV-EP1を阻害する人工配位子を創った。そして、その阻害の効率を向上させることができた。さらに本章においては、そのHIV-EP1の阻害剤がHIV-1遺伝子発現に関わる別の転写因子NF-κBやE1Aとの間で選択性を持つことも示すことができた (Figure 3-13)。

なお、HIV-1遺伝子発現に関わり、HIV-EP1と同様にC₂H₂型亜鉛フィンガーを持つ転写因子にSp1がある (Figure 3-1)³⁷⁾。HIV-EP1の阻害剤がSp1との間で選択性を持つかどうかについて、現在検討している。まず、前章までに合成した化合物によるSp1とDNAの結合の阻害効果を、ゲ

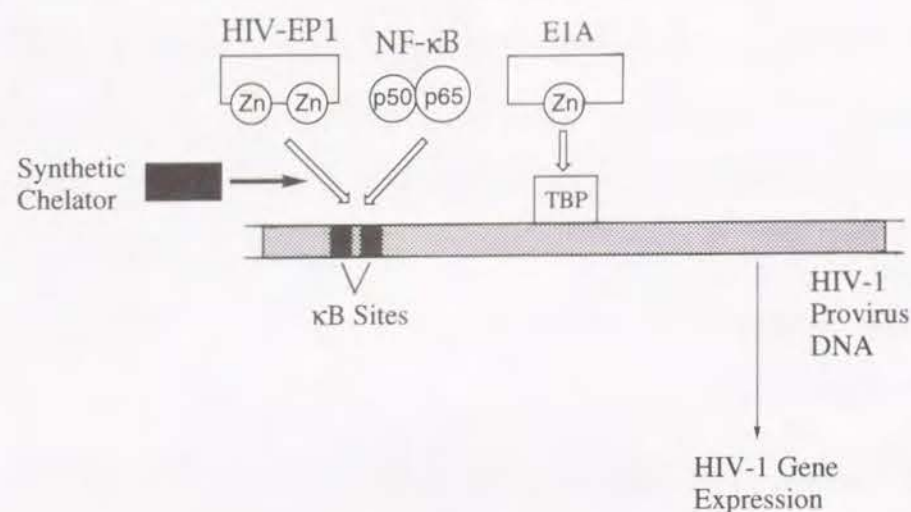


Figure 3-13. Selective inhibition of HIV-EP1 by synthetic chelator.

ルシフトアッセイを用いて調べた。その結果、HIV-EP1-DNAを300 μ Mの濃度で阻害した (Figure 2-6) 脂溶性の高いアルキルチオ体14、15、16、17、18が、Sp1とDNAの結合に対しては同濃度で阻害効果を示さないことがわかった [DNA-bound Sp1: 71% (14), 96% (15), 90% (16), 100% (17), 100% (18)]。また、HIV-EP1-DNAに対してはカルボキシル体6や7よりも極性の低いメチルエステル体5の方が強い阻害効果を示したが (Figure 1-10)、Sp1-DNAに対しては300 μ Mの濃度で6、7よりも5の方が弱い阻害効果を示した [DNA-bound Sp1: 29% (5), 2% (6), 1% (7)]。これらの結果から、HIV-EP1の脂溶性の高い阻害剤はSp1の機能を阻害しづらい傾向があり、HIV-EP1に対する選択性を示したといえる。第一章で述べたように、この阻害反応においては阻害剤が亜鉛に近づいて生じた遷移状態（または不安定中間体）の安定性が重要であると考えられる。すなわち、同じ C_2H_2 型亜鉛フィンガーを持つHIV-EP1とSp1の間で、その亜鉛フィンガー部位の環境の違いに起因して遷移状態（または不安定中間体）の安定性に差異が出て選択性が生じたと推定している。

ただし、この阻害剤はこのまますぐにエイズの発症を抑える医薬品や、*in vivo*で使用するこ
のできるバイオリジカルツールとなるわけではない。しかしながら、転写因子の亜鉛フィンガー
部位を標的とした薬物が可能であるという、創薬における新しい視点を示すことができたと思
えている。

このような薬物の開発においては、細胞内に多く存在する金属蛋白質の中で標的となる亜鉛
フィンガー蛋白質のみに作用するかという点が、おそらく問題となるであろう。しかし、亜鉛
フィンガー蛋白質間で選択性を示したことから、この問題は解決し得ると考えている。また、
このような人工配位子に標的蛋白質へのターゲッティングの工夫を施すことも可能であろう。

本研究の成果が、遺伝子発現の制御を目指す次世代の創薬の礎になることが期待される。

第四章 総括

近年の分子生物学の発展に伴い、遺伝子の発現調節を担う転写因子などの蛋白質の構造や機能が明らかになってきた。特定の転写因子の機能を阻害することができれば、その転写因子が調節する特定の遺伝子の発現が選択的に抑えられると考えられる。このアプローチは、医薬品の開発や遺伝子発現機構の解明に寄与すると期待される。遺伝子の機能を阻害する化合物としてDNAに作用する天然物や合成化合物はこれまでに多く報告されているが、特定の転写因子を標的とした阻害剤はほとんど知られていない。本研究では、亜鉛フィンガー蛋白質を始めとする転写因子の機能制御を目的とした人工化合物の分子設計、合成、活性評価を行ない、以下のような幾つかの興味深い知見が得られた。

第一章 イミダゾール配位子によるHIV-EP1のDNA結合の阻害^{123,124)}

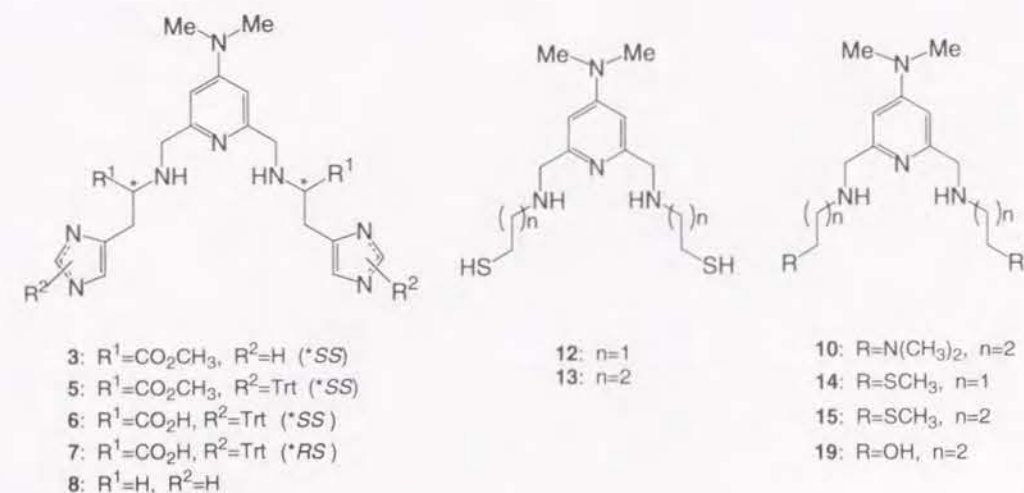
HIV-EP1はエイズのプロウイルスのDNAに結合する転写因子で、DNA認識部位として2つのC₂H₂型亜鉛フィンガーを持っている。亜鉛を強固にとりこむ配位子を設計することができれば、HIV-EP1から立体構造を構築している亜鉛を除去し、その機能を阻害できると考えた。そこで亜鉛酵素の亜鉛結合部位に見られるイミダゾール基やカルボキシル基を持った複素環配位子**3**、**5-8**およびそのジメチルアミノ誘導体**10**を合成した。これらの化合物が亜鉛配位能力を持つことはNMRスペクトルを用いて確かめられた。次にゲルシフト実験を行なった結果、**3**、**5-8**はEDTAより強くHIV-EP1とDNAの結合を阻害した。その中でも**3**や**8**は特に強い阻害効果を示した。これに対して**10**の阻害活性は弱く、イミダゾール基の有効性が確かめられた。さらに**3**や**8**によって阻害されたHIV-EP1とDNAの結合は亜鉛を加えると回復することから、この阻害は予想通り亜鉛フィンガーからの亜鉛の除去に起因することが示唆された。しかし、必ずしも亜鉛に高い配位能力を持つ化合物が強い阻害効果を示さなかった。これは、配位子による電子的効果や立体障害などが阻害反応に寄与しているためと考えられる。

第二章 メルカプト配位子による効率的な阻害¹²⁵⁾

すべての亜鉛フィンガー蛋白質が亜鉛結合部位に持つメルカプト基は金属から電子の逆供与を受けられることができるため、亜鉛と強く結合することが知られている。そこでイミダゾール基に代わってメルカプト基を導入した化合物**12**、**13**およびその類縁体**14**、**15**、**19**を合成した。ゲルシフト実験を行なったところ、予想通り**12**と**13**は**3**よりも強くHIV-EP1とDNAの結合を阻害することがわかった。特に**12**のIC₅₀は約4 μMで、**3**の10倍と最も強い阻害効果を示した。これに対して**14**、**15**、**19**の阻害活性は弱く、メルカプト基が阻害に重要であることが確かめられた。**12**によって阻害されたHIV-EP1とDNAの結合は亜鉛を加えても回復しなかった。これは阻害が亜鉛の除去に起因するのではなく、亜鉛酵素の阻害剤に見られるようにメルカプト基の亜鉛との結合に起因するためと推測される。

第三章 転写因子阻害における選択性¹²⁴⁾

HIV-EP1はDNAのκB配列(5'-GGGACTTTCC-3')に特異的に結合するが、免疫系の遺伝子の発現に関与する転写因子NF-κBもκB配列に結合することが知られている。NF-κBはRelホモロジー蛋白質であり、亜鉛フィンガーを持たない。ホルボールエステルなどで細胞を刺激するとHIV-EP1とNF-κBの両方が同時に誘導されるため、各々の転写因子の役割解明の見地から、これまでに合成したHIV-EP1阻害剤のNF-κBに対する影響を検討した。ゲルシフト実験の結果、**3**はNF-κBとDNAの結合を阻害しなかったが、意外なことに、**6**、**7**とその亜鉛錯体がNF-κBとDNAの



結合を阻害することがわかった。6,7の亜鉛錯体はHIV-EP1とDNAの結合を阻害しないことから、NF- κ Bの機能を選択的に阻害することが示された。

一方、C₄型亜鉛フィンガーを持つアデノウイルスE1AはTATA結合蛋白質(TBP)と結合し、転写因子複合体を形成する。E1AとTBPとの結合に対する3の阻害効果をTBPビーズを用いて調べた。その結果、IC₅₀は約100 mMもの高い値であり、HIV-EP1とDNAの結合がほとんど消失する300 μ Mの3によっては阻害が全く見られなかった。

このように、同時に誘導され κ B配列に競合的に結合する2つの転写因子HIV-EP1とNF- κ Bを、化合物を使い分けることによって区別して阻害することができた。また、亜鉛フィンガー蛋白質間においてもHIV-EP1のみを阻害することができた。

本研究成果は、従来、未開拓であった亜鉛フィンガー蛋白質の機能を阻害する新規化合物の開発に価値ある情報を提供するばかりでなく、遺伝子発現の制御を目指す次世代の創薬の礎にもなり得ると考えられる。

実験の部

融点(mp)は全て柳本微量融点測定機で測定し、測定温度未補正で示した。旋光度($[\alpha]^{25}_{\text{D}}$)はJASCO DIP-1000で測定した。溶媒はスペクトル用のものを用いた。NMRスペクトルはVarian VXR-200で測定、または京都大学化学研究所NMR室に依頼し、JEOL JNM-GX 400装置で測定した。化学シフト値はテトラメチルシランを内部標準物質としてppmで表示した。IRスペクトルは京都大学化学研究所IR室に依頼し、HITACHI 260-50で測定した。FAB高分解能質量分析[HRMS(FAB)]スペクトルは日本電子株式会社分析機器技術本部に依頼し、JEOL JMS-SX102Aで測定した。その他の質量分析[HRMS or MS(FAB)]スペクトルは京都大学化学研究所質量分析室に依頼し、JEOL JMS-DX300で測定した。元素分析(Anal)は京都大学化学研究所元素分析室に依頼し、Yanaco CORDER MT-5で行なった。HPLCはTOSOH 8011シリーズを用い、254 nmで検出した。カラムクロマトグラフィー用シリカゲルには、Cica-MERCK 7734-5Bを用いた。

HIV-EP1プラスミド、E1A、TBPプラスミドは、理研ライフサイエンスつくば研究センター 石井俊輔 博士より供給されたものを用いた。NF- κ B (p50)₂、(p65)₂、p50ビーズ⁹³⁾、p65ビーズ⁹³⁾は、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合蛋白質として発現させ、グルタチオンアガロースで精製したものまたはグルタチオンセファロースに結合させたものを、東京大学医科学研究所 井上純一郎 助教授より供給された。ヒトJurkat T細胞から得たNF- κ B (核抽出物)および³⁵S-メチオニンでラベルしたI κ B- α も、井上純一郎 助教授より供与された。また、水は蒸留水をさらにSYBRON NANOpure II超純水製造装置によって精製したものを用いた。イメージアナライザーはFUJIX BASS 2000を用いた。

第一章に関する実験

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[[(S)-1-(methoxycarbonyl)-2-[(triphenylmethyl)imidazol-4-yl]ethyl]-amino]methyl]pyridine (**5**)

ジクロロメタン (16 ml) に溶かした **3** (94.3 mg, 0.195 mmol)^{52,53} に 5 °C にて臭化トリフェニルメチル (0.146 g, 0.451 mmol) を加え、引き続き 5 °C にてピリジン (47 μ l, 0.58 mmol) を加えた。室温にて 19 時間攪拌した後、水 (1 ml) を加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液によって中和した。有機層を分離した後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残さをヘキサン (15 ml) で 5 回洗浄し、**5** (0.166 g, 88%) を淡黄色固体として得た。

mp 94-96 °C

$[\alpha]_D^{20}$ -2.6° (c = 1.0, CHCl₃)

R_f 0.30 (Merck 15696 developed with CH₃OH).

¹H NMR (CD₃OD) δ 2.91 (d, *J* = 6.0 Hz, 4H), 2.98 (s, 6H), 3.0-3.5 (m, 2H), 3.4-3.6 (m, 2H), 3.57 (s, 6H), 3.70 (d, *J* = 14.0 Hz, 2H), 6.58 (s, 2H), 6.68 (s, 2H), 7.0-7.5 (m, 32H).

¹³C NMR (CD₃OD) δ 33.5, 40.2, 53.1, 54.7, 63.0, 77.6, 105.5, 122.1, 130.05, 130.14, 131.7, 138.5, 140.1, 144.3, 158.2, 160.2, 176.5.

IR (KBr) 3420, 1730, 1640, 1490, 1440, 1160, 1130, 1000, 750, 700 cm⁻¹.

HRMS (FAB). Calcd for C₆₁H₆₁O₄N₈: 969.4816. Found: 969.4824.

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[[(S)-1-carboxy-2-[(triphenylmethyl)imidazol-4-yl]ethyl]amino]-methyl]pyridine (**6**) and 4-(Dimethylamino)-2-[[[(S)-1-carboxy-2-[(triphenylmethyl)imidazol-4-yl]ethyl]amino]methyl]-6-[[[(R)-1-carboxy-2-[(triphenylmethyl)imidazol-4-yl]ethyl]amino]methyl]-pyridine (**7**)

メタノール (2.5 ml) に溶かした **5** (19.5 mg, 0.0201 mmol) に室温にて 0.155 M 水酸化リチウム水溶液 (1.3 ml, 0.20 mmol) を加え、室温にて 16 時間攪拌した。反応液を 1 N 塩酸水溶液によって中和した後、減圧濃縮した。残さを五酸化二リンで乾燥した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (メタノール) によって精製し、**6** (3.2 mg, 17%) と **7** (1.7 mg, 9%) をそれぞれ淡黄色固体として得た。

6

mp 213-215 °C

$[\alpha]_D^{20}$ +2.2° (c = 1.0, CHCl₃)

R_f 0.58 [Merck 5714 developed with CH₂Cl₂-CH₃OH (5 : 1)], 0.47 (Merck 15696 developed with CH₃OH).

¹H NMR (CD₃OD) δ 2.6-3.5 (m, 6H), 2.83 (s, 6H), 3.49 (ABq, Δ_{vAB} = 38.0 Hz, *J* = 28.0 Hz, 4H), 6.15 (s, 2H), 6.65 (s, 2H), 6.8-7.5 (m, 30H), 7.31 (s, 2H).

¹³C NMR (CD₃OD) δ 32.7, 40.1, 56.9, 66.2, 77.7, 105.0, 121.8, 130.0, 130.1, 131.8, 139.4, 141.0, 144.6, 160.2, 162.2, 182.8.

IR (KBr) 3380, 1600, 1490, 1440, 1390, 1130, 750, 700 cm⁻¹.

HRMS (FAB). Calcd for C₅₉H₅₇O₄N₈: 941.4503. Found: 941.4504.

7

mp 192-194 °C

R_f 0.39 [Merck 5714 developed with CH₂Cl₂-CH₃OH (5 : 1)], 0.47 (Merck 15696 developed with CH₃OH).

¹H NMR (CD₃OD) δ 2.6-3.5 (m, 8H), 3.01 (s, 6H), 3.78 (d, *J* = 36.0 Hz, 2H), 6.39 (s, 2H), 6.77 (s, 2H), 7.0-7.5 (m, 32H).

¹³C NMR (CD₃OD) δ 32.3, 40.1, 55.5, 66.4, 77.4, 104.9, 121.8, 129.9, 131.5, 139.9, 140.7, 144.3, 160.4, 162.1, 182.4.

IR (KBr) 3390, 1600, 1490, 1440, 1390, 1130, 750, 700 cm⁻¹.

HRMS (FAB). Calcd for C₅₉H₅₇O₄N₈: 941.4503. Found: 941.4505.

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[[2-(imidazol-4-yl)ethyl]amino]methyl]pyridine (**8**)

16の合成法 ("第二章に関する実験" に記載) に従って、ヒスタミン塩酸塩 (**38**) から合成した。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製した後、メタノールに溶かし、室温にて 2 当量のナトリウムメトキシドを加えた。室温にて 10 分間攪拌した後、減圧濃縮し、残さにジクロロメタンを加えた。不溶物をろ過後、ろ液を濃縮して **8** (収率 13%) を淡黄色固体として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 2.78 (t, *J* = 6.0 Hz, 4H), 2.90 (t, *J* = 6.0 Hz, 4H), 2.96 (s, 6H), 3.78 (s, 4H), 6.33 (s, 2H), 6.74 (s, 2H), 7.46 (s, 2H).

IR (KBr) 3400, 2920, 1600, 1430, 1380, 1210, 1100, 980, 820, 620 cm⁻¹.

HRMS. Calcd for C₁₉H₂₈N₈: 368.2436. Found: 368.2407.

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[[3-(dimethylamino)propyl]amino]methyl]pyridine (**10**)

メタノール (5.4 ml) に溶かした *N,N*-ジメチル-1, 3-プロパンジアミン (**39**, 56.0 mg, 0.548 mmol) に、粉碎後強いバーナーの炎で 1 時間加熱したモレキュラーシーブス 3A (0.55 g) を加え、引き続き室温にて 4-(ジメチルアミノ)ピリジン-2,6-ジカルボアルデヒド (48.8 mg, 0.274 mmol) を加えた。室温にて 16 時間攪拌した後、同温度にてシアン化水素化ホウ素ナトリウム (95%, 59.5 mg, 0.900 mmol) を加えた。室温にて 7 時間攪拌した後、ろ過し、ろ液を 1N 塩酸水溶液に

よってpH 2とした。室温にて1時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液によって中和し、減圧濃縮した。残さを五酸化二リンで乾燥した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン:メタノール=10:1から1:5まで段階的に変化）によって精製し、**10** (39.9 mg, 42%) を油状物質として得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ 2.16 (quint, $J = 6.0$ Hz, 4H), 2.41 (s, 12H), 2.72 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 3.00 (s, 6H), 3.12 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 4.05 (s, 4H), 4.64 (br, 2H), 6.44 (s, 2H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 25.3, 40.4, 45.3, 48.3, 53.5, 58.7, 106.5, 155.0, 158.6.

IR (KBr) 3380, 2920, 2680, 1600, 1540, 1460, 1390, 1210, 1150, 980, 830 cm^{-1} .

HRMS. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{N}_6$: 350.3157. Found: 350.3146.

[2-(Methoxycarbonyl)ethyl]amine (**41**)

メタノール (455 ml) に溶かした β -アラニン (**40**, 10.1 g, 0.113 mol) に5 $^\circ\text{C}$ にて塩化チオニル (33.2 ml, 0.455 mol) を滴下し、室温にて4日間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、残さにメタノール (50 ml) を加え、引き続きエーテル (900 ml) を加えた。5 $^\circ\text{C}$ で1.5 日間放置後、析出した結晶をろ過し、五酸化二リンで乾燥して**41**·HCl (14.9 g, 95%) を白色結晶として得た。

mp 104-105 $^\circ\text{C}$

^1H NMR (CD_3OD) δ 2.73 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.19 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.71 (s, 3H).

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[[2-(methoxycarbonyl)ethyl]amino]methyl]pyridine (**11**)

16の合成法（“第二章に関する実験”に記載）に従って、**41**·HCl から合成した。**11**は固体として得られた（収率 66%）。

^1H NMR (CD_3OD) δ 2.71 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H), 3.03 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H), 3.10 (s, 6H), 3.70 (s, 6H), 4.00 (s, 4H), 6.71 (s, 2H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 33.9, 40.5, 45.7, 53.5, 53.6, 106.1, 155.5, 158.8, 175.5.

IR (KBr) 3390, 2920, 1730, 1610, 1440, 1390, 1210, 1080, 1000, 830 cm^{-1} .

HRMS. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4$: 352.2110. Found: 352.2093.

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[[2-carboxyethyl]amino]methyl]pyridine (**9**)

メタノール (5.6 ml) に溶かした**11** (14.3 mg, 0.0406 mmol) に室温にて0.155 M水酸化リチウム水溶液 (2.6 ml, 0.403 mmol) を加え、室温にて12時間攪拌した。反応液を1 N塩酸水溶液によってpH 7とした後、減圧濃縮した。残さを五酸化二リンで乾燥して**9**を粗生成物として得た。トル

エンを内部標準としてNMRで定量し、ゲルシフト実験に用いた。

^1H NMR (CD_3OD) δ 2.53 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 3.05 (s, 6H), 3.16 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 4.17 (s, 4H), 6.67 (s, 2H).

MS (FAB) m/z 325($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

1の亜鉛錯体 (**1-Zn**)

3-Znの合成法（後述）に従って**1**から合成した。

^1H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-\text{D}_2\text{O}(4:1)$) δ 3.3-3.5 (m, 4H), 3.79 (s, 6H), 6.86 (s, 2H), 8.04 (s, 2H), 8.22 (m, 3H).

^{13}C NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-\text{D}_2\text{O}(4:1)$) δ 27.2, 54.5, 54.5, 125.7, 127.2, 132.1, 139.2, 141.7, 149.8, 166.7, 173.7.

2の亜鉛錯体 (**2-Zn**)

3-Znの合成法（後述）に従って**2**から合成した。

^1H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-\text{D}_2\text{O}(4:1)$) δ 2.72 (d, $J = 15.6$ Hz, 2H), 3.1-5.0 (m, 8H), 3.68 (s, 6H), 7.16 (s, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.8-8.5 (m, 3H).

3の亜鉛錯体 (**3-Zn**)

重メタノール-重水 (4:1, 0.5 ml) に溶かした**3** (24.0 mg, 0.0495 mmol) に室温にて硫酸亜鉛七水和物 (15.7 mg, 0.0546 mmol) を加え、**3-Zn**の溶液を得た。

^1H NMR (CD_3OD) δ 2.7-3.5 (m, 6H), 3.11 (s, 3H), 3.13 (s, 3H), 3.71 (s, 6H), 4.16 (ABq, $\Delta_{\text{vAB}} = 86.0\text{Hz}$, $J = 18.0$ Hz, 4H), 6.68 (s, 2H), 7.15 (s, 2H), 8.45 (s, 2H).

^{13}C NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-\text{D}_2\text{O}(4:1)$) δ 27.9, 39.8, 52.0, 53.4, 63.6, 103.8, 104.3, 117.0, 136.2, 139.2, 155.9, 158.4, 158.6, 173.7.

IR (KBr) 3120, 2910, 1730, 1620, 1540, 1440, 1390, 1110, 1030, 840, 610 cm^{-1} .

HRMS (FAB). Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{N}_8\text{Zn}$: 547.1760. Found: 547.1794.

5の亜鉛錯体 (**5-Zn**)

3-Znの合成法に従って**5**から合成した。

^1H NMR (CD_3OD) δ 2.68 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H), 3.14 (s, 6H), 2.9-3.4 (m, 2H), 3.33 (s, 6H), 4.21 (ABq, $\Delta_{\text{vAB}} = 212.0$ Hz, $J = 20.0$ Hz, 4H), 6.72 (s, 2H), 6.93 (s, 2H), 6.9-7.6 (m, 30H), 8.68 (s, 2H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 28.6, 40.7, 53.1, 54.2, 65.0, 79.1, 104.9, 123.3, 130.4, 130.5, 131.6, 137.6, 143.4, 157.7, 159.6, 174.0.

IR (KBr) 3410, 1730, 1620, 1490, 1440, 1120, 1030, 750, 700 cm^{-1} .
HRMS (FAB). Calcd for $\text{C}_{61}\text{H}_{59}\text{O}_4\text{N}_8\text{Zn}$: 1031.3951. Found: 1031.3949.

6の亜鉛錯体 (6-Zn) および7の亜鉛錯体 (7-Zn)

メタノール (5.9 ml) に溶かした5 (42.6 mg, 0.0440 mmol) に室温にて0.155 M 水酸化リチウム水溶液 (2.8 ml, 0.43 mmol) を加え、室温にて8時間攪拌した。反応液を1 N 塩酸水溶液によってpH 4とした後、減圧濃縮した。残さを五酸化二リンで乾燥した後、シリカゲル分取用TLC (Merck 7747, ジクロロメタン:メタノール = 5:1) によって精製し、6-Zn (8.5 mg, 19%; complex A:complex B = 83:17) と7-Zn (9.7 mg, 22%) をそれぞれ淡黄色固体として得た。

6-Zn

^1H NMR (CD_3OD) δ 2.71 (d, $J = 4.4$ Hz, 4H), 3.10 (s, 6H), 3.28 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 3.92 (ABq, $\Delta_{\text{vAB}} = 161.6$ Hz, $J = 16.9$ Hz, 4H), 6.61 (s, 2H), 6.92 (s, 2H), 7.1-7.4 (m, 30H), 8.40 (s, 2H) (complex A).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 30.6, 40.5, 53.4, 67.4, 79.2, 105.2, 122.7, 130.3, 130.4, 131.6, 139.5, 142.4, 143.7, 156.6, 159.8, 177.7 (complex A).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 31.7, 40.5, 55.6, 67.4, 78.2, 104.7, 122.1, 130.1, 130.2, 131.6, 138.9, 141.2, 144.2, 155.4, 159.8 (complex B).

IR (KBr) 3410, 2920, 1620, 1490, 1450, 1390, 1260, 1090, 1040, 800, 750, 700 cm^{-1} .

HRMS (FAB). Calcd for $\text{C}_{59}\text{H}_{55}\text{O}_4\text{N}_8\text{Zn}$: 1003.3638. Found: 1003.3685.

7-Zn

^1H NMR (CD_3OD) δ 2.7-3.4 (m, 6H), 3.09 (s, 6H), 3.6-3.8 (br, 1H), 3.98 (ABq, $\Delta_{\text{vAB}} = 208.0$ Hz, $J = 20.0$ Hz, 2H), 4.2-4.4 (br, 1H), 6.55 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 7.0-7.5 (m, 31H), 8.49 (s, 1H).

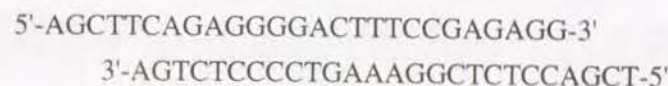
^{13}C NMR (CD_3OD) δ 31.0, 31.5, 40.6, 51.8, 52.9, 66.6, 66.8, 77.8, 79.1, 105.1, 105.5, 122.0, 122.7, 130.1, 130.2, 130.3, 130.4, 131.6, 131.7, 139.2, 139.9, 140.6, 142.3, 143.6, 144.5, 155.7, 156.6, 159.8.

IR (KBr) 3410, 2920, 1620, 1490, 1450, 1390, 1260, 1090, 1030, 800, 750, 700 cm^{-1} .

HRMS (FAB). Calcd for $\text{C}_{59}\text{H}_{55}\text{O}_4\text{N}_8\text{Zn}$: 1003.3638. Found: 1003.3661.

オリゴヌクレオチドの5'-末端標識

二本鎖DNAオリゴヌクレオチドとしては、マウス免疫グロブリン κ 軽鎖のエンハンサーの一部である、 κB 配列を含む二本鎖オリゴヌクレオチド



を用いた。5'-末端標識はT4ポリヌクレオチドキナーゼ (Takaraから購入) および $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (AmershamまたはDu pontから購入) を用いて行なった。標識後、G-50セファデックススピンカラムにより精製した。

HIV-EP1 DNA結合ドメインの調整

発現した $\beta\text{-gal-HIV-EP1}$ を保持する菌体[BL21(DE3)]を遠心操作にて集菌後、1 mg/mlのリゾチームを含む緩衝液A [50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.5 mM EDTA, 0.4 M NaCl, 5 mM MgCl_2 , 5% (vol/vol) グリセリン, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM ジチオトレイトール]を初濃度が5%となるように懸濁した。氷中に30分間放置し、液体窒素による凍結と融解を2回行なった。EDTAとNP-40をそれぞれ終濃度が1 mMと0.5% (vol/vol) になるように加え、超音波破碎処理 (10 sec x 5) を施し、遠心分離 (5,000 rpm, 10分間) を行なった。不溶性画分を緩衝液B [10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA, 0.4 M NaCl, 0.5% (vol/vol) NP-40, 5% (vol/vol) グリセリン, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM ジチオトレイトール]で洗浄し、Urea緩衝液 [50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% トリトンX-100, 6 M Urea, 5% (vol/vol) グリセリン, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM ジチオトレイトール]に溶解させた。氷中に1時間放置した後、遠心分離 (42,000 rpm, 10分間) し、上清をTDE緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM ジチオトレイトール, 1 mM EDTA) で透析した。グリセリンを濃度が20% (vol/vol) になるように加え、保存は-80 $^{\circ}\text{C}$ で行なった。

ゲルシフト実験

HIV-EP1 (約500 ng)、合成化合物、Binding緩衝液 (15 mM Tris-HCl, pH 7.0, 75 mM NaCl, 1.5 mM EDTA, 1.5 mM ジチオトレイトール, 7.5% グリセリン, 0.3% NP-40, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA)、4% メタノール、poly(dI-dC) (2.4 μg) を含む反応溶液を20 $^{\circ}\text{C}$ で30分間放置した。5'-末端標識オリゴヌクレオチド (30,000 cpm) を加え、20 $^{\circ}\text{C}$ で15分間放置した。反応溶液 (全量 24 μl) を4%ポリアクリルアミドゲルを用いて、0.25 x TBE緩衝液中150 CVで電気泳動した。阻害活性の評価は、バンドの放射性をイメージアナライザーにより定量することで行なった。

エチジウム置換実験

75 mM NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 水溶液中に溶かしたエチジウムブロマイド (2.1 μ M) にオリゴヌクレオチド (ゲルシフト実験に用いたもの、ただし 32 Pでラベルしていないもの、1 equiv) を加え、蛍光を測定した (励起波長: 505 nm、590 nmに最大波長を持つ蛍光スペクトルを測定、HITACHI F-3010を使用)。さらに、**3** (50 equiv) を加え、スペクトルの変化を調べた。

DNase I フットプリンティング実験

5'-末端標識DNA断片 (約2000 cpm)、1 mM **3**、22 mM Tris-HCl, pH 7.0、1 mM MgCl₂、83 mM NaCl、4% メタノール、超音波処理した子牛胸腺DNA (1 μ g) を含む反応溶液 (全量18 μ l) を20 $^{\circ}$ Cで2時間放置した。0.0014 unitのDNase Iを加え、20 $^{\circ}$ Cで1分間インキュベートした。500 mM EDTA 2 μ lと3 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) 2 μ lを加え、エタノール沈殿を行ないDNAを回収した。3 μ lの泳動用緩衝液 (95% ホルムアミド, 10 mM EDTA, 0.01% ブロモフェノールブルー) を加え、7 M尿素を含んだ10%ポリアクリルアミドゲルを用いて、TBE緩衝液 (89 mM トリス-ホウ酸, pH 8, 2 mM EDTA) 中2000 CVで電気泳動した。

銅錯体のESRスペクトルの測定

既知法⁵³⁾に従って行なった。

第二章に関する実験

[2-(*tert*-Butylthio)ethyl]amine (**43**)⁶²⁾

2 N 塩酸水溶液 (16 ml) に溶かした2-アミノエタンチオール塩酸塩 (**42**, 3.97 g, 34.9 mmol) に室温にて*tert*-ブチルアルコール (4.3 ml, 46 mmol) を加え、11時間加熱環流した。反応液を減圧濃縮した後、残さを五酸化二リンで乾燥した。粉碎後、アセトン (20 ml) で4回洗浄した。得られた固体を4 N 塩酸水溶液から再結晶することにより、**43**·HCl·1/3H₂O (1.19 g, 19%) を白色結晶として得た。

mp 190-193 $^{\circ}$ C

¹H NMR (CD₃OD) δ 1.32 (s, 9H), 2.79 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.07 (t, J = 7.0 Hz, 2H).

IR (KBr) 2950, 1600, 1450, 1360, 1250, 1160, 1130, 1070, 930, 910, 730 cm⁻¹.

MS (FAB) m/z 134 (M+H)⁺.

Anal. Calcd for C₆H₁₅NS·HCl·1/3H₂O: C, 41.01; H, 9.56; N, 7.97. Found: C, 41.32; H, 9.47; N, 8.21.

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[[2-(*tert*-butylthio)ethyl]amino]methyl]pyridine (**16**)

メタノール (3.0 ml) に溶かした4-(ジメチルアミノ)ピリジン-2,6-ジカルボアルデヒド (**31**, 102 mg, 0.572 mmol) と**43**·HCl·1/3H₂O (195 mg, 1.11 mmol) に室温にてシアン化水素化ホウ素ナトリウム (95%, 91.0 mg, 1.38 mmol) を加え、室温にて36時間攪拌した。反応液に室温にて水 (2 ml) を加え、同温度にて5時間攪拌した後、減圧濃縮した。残さを五酸化二リンで乾燥した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン:メタノール = 30:1から5:1まで段階的に変化) によって精製し、**16** (113 mg, 49%) を無色油状物質として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.30 (s, 18H), 2.76 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 2.90 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 3.19 (s, 6H), 4.01 (s, 4H), 5.92 (brs, 2H), 6.65 (s, 2H).

¹³C NMR (CD₃OD) δ 28.7, 32.2, 40.6, 44.1, 50.5, 53.3, 106.3, 155.6, 158.9.

IR (KBr) 2960, 2320, 1610, 1550, 1460, 1390, 1360, 1160, 1120 cm⁻¹.

HRMS (FAB). Calcd for C₂₁H₄₁N₄S₂: 413.2773. Found: 413.2740.

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[N-[(2-nitrophenyl)thio]-N-[2-[(2-nitrophenyl)dithio]ethyl]amino]-methyl]pyridine (**47**)

酢酸 (0.9 ml) に溶かした**16** (10.5 mg, 0.0254 mmol) に室温にて塩化2-ニトロベンゼンスルフェ

ニル (58.0 mg, 0.306 mmol) を加え、室温にて16時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、残さにジクロロメタン (10 ml) と水 (5 ml) を加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液によって中和した。有機層を分離した後、減圧濃縮した。残さをシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル = 10:1、次いで酢酸エチル、最後にジクロロメタン:メタノール = 10:1) によって精製し、**47** (17.8 mg, 77%) を黄色固体として得た。同様な方法で**18**からも**47**を収率70%で得た。

mp 88-91 °C

¹H NMR (CDCl₃) δ 2.93 (t, *J* = 6.0 Hz, 4H), 3.03 (s, 6H), 3.51 (br, 4H), 4.34 (br, 4H), 6.50 (s, 2H), 7.19-7.39 (m, 4H), 7.53-7.76 (m, 4H), 8.01-8.33 (m, 8H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 36.7, 39.3, 55.6, 63.6, 104.6, 124.8, 125.1, 125.9, 126.0, 126.1, 127.1, 133.9, 134.1, 137.2, 142.1, 145.1, 145.3, 155.6, 156.4.

IR (KBr) 3420, 1590, 1510, 1330, 1300, 730 cm⁻¹.

HRMS (FAB). Calcd for C₃₇H₃₇O₈N₈S₆: 913.1059. Found: 913.1068.

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[N-[2-[(2-nitrophenyl)dithio]ethyl]amino]methyl]pyridine (**22**)

ジクロロメタン-メタノール (2:3, 2.5 ml) に溶かした**47** (17.8 mg, 0.0195 mmol) に室温にて3-メチルインドール (17.9 mg, 0.136 mmol) を加え、引き続き5 °Cにて0.5 N 塩酸水溶液 (0.6 ml, 0.3 mmol) を加えた。室温にて9時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液によって中和し、減圧濃縮した。残さにジクロロメタン (30 ml) と水 (5 ml) を加え、振とう後、有機層を分離し、減圧濃縮した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル、次いでジクロロメタン:メタノール = 10:1) によって精製し、**22** (10.4 mg, 88%) を黄色固体として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 2.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H), 2.92 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H), 3.06 (s, 6H), 3.57 (brs, 2H), 3.84 (s, 4H), 6.46 (s, 2H), 7.26-7.42 (m, 2H), 7.62-7.75 (m, 2H), 8.20-8.39 (m, 4H).

¹³C NMR (CD₃OD) δ 39.3, 40.3, 48.8, 55.5, 105.9, 127.9, 128.5, 129.3, 136.2, 138.8, 147.8, 158.2, 159.7.

IR (KBr) 3420, 2920, 1600, 1510, 1340, 1300, 730 cm⁻¹.

HRMS (FAB). Calcd for C₂₅H₃₁O₄N₆S₄: 607.1290. Found: 607.1264.

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[2-mercaptoethyl]amino]methylpyridine (**12**)

メタノール (11 ml) に溶かした**22** (43.6 mg, 0.0718 mmol) に室温にて水素化ホウ素ナトリウム (40.9 mg, 1.08 mmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、水 (14 ml) を加え、1 N 塩酸水溶液により pH 1 とした。ジクロロメタン (45 ml) で4回洗浄し、水溶液を飽

和炭酸水素ナトリウム水溶液により pH 6-7 とした。ジクロロメタン (45 ml) で5回抽出した後、抽出液を減圧濃縮し、**12** (16.3 mg, 75%) を無色油状物質として得た。**12**の塩酸塩 (淡黄色固体、吸湿性) は、上の反応液を pH 1 としジクロロメタン洗浄した後に水溶液を濃縮して得た。

12

¹H NMR (CDCl₃) δ 2.65 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H), 2.89 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H), 3.01 (s, 6H), 3.84 (s, 4H), 6.34 (s, 2H).

¹³C NMR (CD₃OD) δ 25.4, 40.3, 53.6, 55.1, 105.9, 158.4, 159.2.

HRMS. Calcd for C₁₃H₂₄N₄S₂: 300.1442. Found: 300.1432.

HCl salt of **12**

¹H NMR (CD₃OD) δ 2.93 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H), 3.30 (s, 6H), 3.39 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H), 4.48 (s, 4H), 7.29 (s, 2H).

¹³C NMR (CD₃OD) δ 21.8, 41.7, 49.5, 52.7, 110.6, 145.9, 159.9.

IR (KBr) 3390, 2920, 2740, 1640, 1570, 1410 cm⁻¹.

HRMS (FAB). Calcd for C₁₃H₂₅N₄S₂: 301.1521. Found: 301.1528.

20の物性

淡黄色固体

¹H NMR (CDCl₃) δ 2.87 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H), 2.99 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H), 3.03 (s, 6H), 3.84 (s, 4H), 6.48 (s, 2H).

¹³C NMR (CD₃OD) δ 39.6, 40.4, 49.2, 55.5, 105.9, 158.4, 159.4.

HRMS. Calcd for C₁₃H₂₂N₄S₂: 298.1286. Found: 298.1307.

[2-[(Triphenylmethyl)thio]ethyl]amine (**44**)⁶³⁾

酢酸 (37 ml) に溶かした2-アミノエタンチオール塩酸塩 (**42**, 4.05 g, 35.7 mmol) に60 °Cにてトリチルアルコール (9.29 g, 35.7 mmol) を加え、引き続き60 °Cにて三フッ化ホウ素エチルエーテル (5.2 ml, 41 mmol) を一度に加えた。80 °Cにて30分間攪拌した後、室温に戻した。45分後にエタノール (54 ml) と水 (18 ml) を加えた後、室温にて酢酸ナトリウム (11 g) を加え、引き続き水 (140 ml) を加えた。5 °Cにて一晩放置後、析出した結晶をろ過し、水 (50 ml) で2回、次にアセトン (5 ml) で1回、最後にエーテル (50 ml) で2回洗浄した。五酸化二リンで乾燥して、**44**·HCl·1/2H₂O (6.05 g, 46%) を白色結晶として得た。

mp 88-91 °C

¹H NMR (CD₃OD) δ 2.47 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.50 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.2-7.5 (m, 15H).

IR (KBr) 3450, 2920, 1590, 1490, 1440, 1380, 1180, 1080, 1030, 740, 690 cm⁻¹.

MS (FAB) m/z 338 ($M+H_2O+H$)⁺.

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[[2-[(triphenylmethyl)thio]ethyl]amino]methyl]pyridine (**18**)

16の合成法に従って**44**·HCl·1/2H₂Oから合成した。**18**は白色結晶として得られた(収率41%)。

mp 65-67 °C

¹H NMR (CDCl₃) δ 2.35 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 2.38 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 3.14 (s, 6H), 3.70 (s, 4H), 4.72 (brs, 2H), 6.57 (s, 2H), 7.0-7.5 (m, 30H).

¹³C NMR (CD₃OD) δ 33.3, 40.8, 49.5, 52.4, 68.8, 106.0, 128.7, 129.8, 131.5, 146.9, 155.2, 159.4.

IR (KBr) 3430, 1630, 1600, 1440, 1120, 1030, 740, 700, 450 cm⁻¹.

HRMS (FAB). Calcd for C₅₁H₅₃N₄S₂: 785.3712. Found: 785.3712.

[3-(*tert*-Butylthio)propyl]amine (**46**)⁶⁵⁾

メタノール (10 ml) と水 (10 ml) に溶かした3-クロロプロピルアミン塩酸塩 (**45**, 1.08 g, 8.31 mmol) に5 °Cにて*tert*-ブタンチオール (9.3 ml, 82 mmol) を加え、引き続き5 °Cにてメタノール (5 ml) と水 (10 ml) に溶かした水酸化ナトリウム (5.7 g, 143 mmol) を加えた。室温にて1日攪拌した後、減圧下でメタノールを留去した。反応液を1N 塩酸水溶液によりpH 8とした後、ジクロロメタン (200 ml) で2回抽出した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥した後、1.0 M 塩化水素ジエチルエーテル溶液 (20 ml) を加え、減圧濃縮して**46**·HCl·1/3H₂O (0.984 g, 62%) を白色固体として得た。

mp 142-143 °C

¹H NMR (CD₃OD) δ 1.33 (s, 9H), 1.91 (quint, J = 7.0 Hz, 2H), 2.63 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.02 (t, J = 7.0 Hz, 2H).

IR (KBr) 2960, 1600, 1490, 1440, 1360, 1170, 1010, 960, 840 cm⁻¹.

MS (FAB) m/z 148 ($M+H$)⁺.

Anal. Calcd for C₇H₁₇NS·HCl·1/3H₂O: C, 44.31; H, 9.92; N, 7.38. Found: C, 44.60; H, 9.81; N, 7.07.

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[[3-(*tert*-butylthio)propyl]amino]methyl]pyridine (**17**)

16の合成法に従って、**46**·HCl·1/3H₂Oから合成した。**17**は薄い紫色の油状物質として得られた(収率39%)。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.29 (s, 18H), 1.95 (quint, J = 7.0 Hz, 4H), 2.62 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 2.95 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 3.12 (s, 6H), 4.03 (s, 4H), 6.54 (s, 2H), 6.69 (brs, 2H).

¹³C NMR (CD₃OD) δ 27.1, 29.5, 32.2, 40.4, 43.9, 49.3, 53.6, 106.7, 154.6, 158.4.

IR (KBr) 2950, 2310, 1610, 1540, 1460, 1390, 1360, 1160, 1110 cm⁻¹.

HRMS (FAB). Calcd for C₂₃H₄₅N₄S₂: 441.3086. Found: 441.3081.

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[N-[(2-nitrophenyl)thio]-N-[3-[(2-nitrophenyl)dithio]propyl]amino]methyl]pyridine (**48**)

47の合成法に従って、**17**から合成した。**48**は黄色固体として得られた(収率61%)。

mp 51-54 °C

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.99 (quint, J = 6.5 Hz, 4H), 2.72 (t, J = 6.5 Hz, 4H), 2.97 (s, 6H), 3.32 (br, 4H), 4.27 (br, 4H), 6.42 (s, 2H), 7.17-7.35 (m, 4H), 7.52-7.67 (m, 4H), 7.93-8.04 (m, 2H), 8.13-8.32 (m, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 28.1, 35.8, 39.3, 55.7, 64.2, 104.4, 124.7, 125.1, 126.0, 126.1, 127.2, 133.7, 134.0, 137.6, 142.2, 145.5, 145.9, 155.5, 157.4.

IR (KBr) 3410, 1590, 1510, 1330, 1300, 730 cm⁻¹.

HRMS (FAB). Calcd for C₃₉H₄₀N₈S₆O₈: 941.1372. Found: 941.1368.

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[N-[3-[(2-nitrophenyl)dithio]propyl]amino]methyl]pyridine (**23**)

22の合成法に従って、**48**から合成した。**23**は黄色固体として得られた(収率90%)。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.90 (quint, J = 7.0 Hz, 4H), 2.74 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 2.82 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 2.91 (brs, 2H), 3.00 (s, 6H), 3.76 (s, 4H), 6.39 (s, 2H), 7.27-7.42 (m, 2H), 7.62-7.76 (m, 2H), 8.21-8.34 (m, 4H).

¹³C NMR (CD₃OD) δ 30.5, 37.5, 40.3, 48.9, 55.6, 105.9, 127.9, 128.5, 129.3, 136.2, 138.8, 147.8, 158.3, 159.2.

IR (KBr) 3430, 2920, 1600, 1510, 1330, 1300, 730 cm⁻¹.

HRMS (FAB). Calcd for C₂₇H₃₅O₄N₆S₄: 635.1602. Found: 635.1594.

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[[3-(mercaptopropyl)amino]methyl]pyridine (**13**)

12の合成法に従って(ただし、水素化ホウ素ナトリウムに代わって2.3当量のジチオトレイトールを使用した)、**23**から合成した。**13**は無色油状物質として得られた(収率67%)。**13**の塩酸塩は吸湿性のある淡黄色固体として得られた。

13

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.85 (quint, J = 7.0 Hz, 4H), 2.63 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 2.76 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 3.00 (s, 6H), 3.75 (s, 4H), 6.42 (s, 2H).

¹³C NMR (CD₃OD) δ 23.5, 35.0, 40.3, 49.1, 55.5, 106.0, 158.3, 158.8.

HRMS. Calcd for C₁₅H₂₈N₄S₂: 328.1755. Found: 328.1743.

HCl salt of **13**

^1H NMR (CD_3OD) δ 2.11 (quint, $J = 6.5$ Hz, 4H), 2.67 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H), 3.3-3.4 (m, 4H), 3.33 (s, 6H), 4.47 (s, 4H), 7.34 (s, 2H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 22.7, 32.1, 41.8, 48.9, 49.6, 110.7, 145.7, 160.1.

IR (KBr) 3390, 2920, 2760, 1640, 1570, 1420 cm^{-1} .

HRMS (FAB). Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{S}_2$: 329.1834. Found: 329.1840.

21の物性

淡黄色固体

^1H NMR (CDCl_3) δ 1.93 (quint, $J = 6.5$ Hz, 4H), 2.6-2.9 (m, 8H), 3.01 (s, 6H), 3.79 (s, 4H), 6.43 (s, 2H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 30.3, 37.8, 40.4, 49.2, 55.6, 106.1, 158.4, 158.8.

HRMS. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{S}_2$: 326.1598. Found: 326.1573.

[2-(Methylthio)ethyl]amine (**50**)⁶⁴⁾

2-クロロエチルアミン塩酸塩 (**49**, 2.20 g, 18.9 mmol) に室温にてメチルメルカプタンナトリウム溶液 (ca. 15%, 88 ml, ca. 190 mmol) を加え、室温にて30時間攪拌した。1 N塩酸水溶液により pH 1とした後、減圧下でメチルメルカプタンを留去した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液により pH 7とした後、ジクロロメタン (200 ml) で3回抽出した。1.0 M塩化水素ジエチルエーテル溶液 (40 ml) を加え、減圧濃縮して**50**·HCl (0.459 g, 19%) を淡黄色結晶として得た。

mp 137-140 °C

^1H NMR (CD_3OD) δ 2.11 (s, 3H), 2.74 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.12 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H).

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[2-(methylthio)ethyl]amino]methylpyridine (**14**)

16の合成法に従って、**50**·HClから合成した。**14**は薄い桃色の油状物質として得られた (収率 19%)。

^1H NMR (CDCl_3) δ 2.12 (s, 6H), 2.75 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 2.97 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 3.21 (s, 6H), 4.07 (s, 4H), 5.13 (brs, 2H), 6.66 (s, 2H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 15.9, 34.2, 40.5, 48.8, 53.4, 106.3, 155.9, 158.9.

IR (KBr) 2910, 2320, 1610, 1540, 1430, 1390, 1120 cm^{-1} .

HRMS (FAB). Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{S}_2$: 329.1834. Found: 329.1821.

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[3-(methylthio)propyl]amino]methylpyridine (**15**)

16の合成法に従って、[3-(メチルチオ)プロピル]アミン塩酸塩 (**51**) から合成した。**15**は薄い青色の油状物質として得られた (収率 13%)。

^1H NMR (CDCl_3) δ 2.03 (quint, $J = 6.0$ Hz, 4H), 2.10 (s, 6H), 2.61 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 3.02 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 3.10 (s, 6H), 4.09 (s, 4H), 5.94 (brs, 2H), 6.53 (s, 2H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 16.0, 28.3, 32.8, 40.4, 50.2, 53.6, 106.6, 154.7, 158.5.

IR (KBr) 2910, 2310, 1610, 1540, 1430, 1390, 1110 cm^{-1} .

HRMS. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{S}_2$: 356.2068. Found: 356.2050.

4-(Dimethylamino)-2,6-bis[[3-(hydroxypropyl)amino]methyl]pyridine (**19**)

10の合成法 ("第一章に関する実験"に記載) に従って、3-アミノ-1-プロパノール (**52**) から合成した。**19**は淡黄色固体として得られた (収率 17%)。

^1H NMR (CD_3OD) δ 1.98 (quint, $J = 6.0$ Hz, 4H), 3.05 (s, 6H), 3.18 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 3.72 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 4.20 (s, 4H), 6.69 (s, 2H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 30.7, 40.3, 48.2, 53.1, 61.5, 106.7, 153.6, 158.4.

IR (KBr) 3360, 2920, 1610, 1550, 1440, 1400, 1220, 1070, 840 cm^{-1} .

HRMS. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_2$: 296.2211. Found: 296.2211.

ゲルシフト実験

"第一章に関する実験"に記載した方法で行なった。

第三章に関する実験

(p50)₂、(p65)₂、またはNF-κBのゲルシフト実験

"第一章に関する実験"に記載した方法で行なった。

IκB-αとp50ビーズ（またはp65ビーズ）⁹³⁾の共沈降実験

p50ビーズ（またはp65ビーズ）、合成化合物、Binding緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% Triton X-100)、4% メタノールを含む反応液を、室温で40分間振とうした。³⁵S-メチオニンでラベルしたIκB-α (*in vitro* 転写、翻訳反応により合成)を加え（全量200 μl）、さらに室温で30分間振とうした。ビーズをBinding緩衝液（反応に用いたもの、800 μl）で4回洗浄した。p50ビーズ（またはp65ビーズ）に結合したIκB-αを、10%ポリアクリルアミドSDSゲルを用いて電気泳動した。阻害活性の評価は、バンドの放射活性をイメージアナライザーにより定量することで行なった。

DNAオリゴヌクレオチドとp50ビーズ⁹³⁾の共沈降実験

p50ビーズ、合成化合物、Binding緩衝液 (15 mM Tris-HCl, pH 7.0, 75 mM NaCl, 1.5 mM EDTA, 1.5 mM ジチオトレイトール, 7.5% グリセリン, 0.3% NP-40, 1 μg/μl BSA)、4% メタノール、poly(dI-dC) (5.0 μg) を含む反応液を、室温で40分間振とうした。5'-末端標識オリゴヌクレオチド（ゲルシフト実験に用いたもの）を加え（全量300 μl）、さらに室温で20分間振とうした。p50ビーズをBinding緩衝液（反応に用いたもの、650 μl）で3回洗浄した。阻害活性の評価は、p50ビーズに結合したオリゴヌクレオチドの量をシンチレーションカウンターを用いて定量することで行なった。

TBPビーズの調整

発現したTBP-GSTを保持する菌体を遠心操作にて集菌後、PBS (30 ml) を加え、超音波破碎処理 (30sec. X 5) を施した。液体窒素による凍結と融解を行なった後、さらに超音波破碎処理 (30sec. X 5)、次いで液体窒素による凍結と融解を行なった。10% Triton X-100を終濃度が1%になるように加え、遠心分離 (10,000 rpm, 10分間) を2回行なった。上清にグルタチオンセファロース 4B（市販品500 μlをPBS 10 mlで2回洗浄したもの）を加え、室温で30分間ゆっくり振とうした。遠心分離 (10,000 rpm, 2分間) を行ない、不溶性画分をPBS (20 ml) で3回洗浄した。これを全量が1.5 mlになるようにPBSに懸濁し、保存は4℃で行なった。

E1AとTBPビーズを用いた共沈降実験

E1A、合成化合物、Binding緩衝液 (50 mM HEPES, pH 7.2, 250 mM NaCl, 1.5 mM EDTA, 1.5 mM ジチオトレイトール, 0.3% NP-40, 0.1% Triton X-100, 0.1 mM PMSF)、4% メタノールを含む反応液を、室温で30分間放置した。TBPビーズを加え（全量230 μl）、氷上で1時間放置した（15分間おきにtappingを行なった）。ビーズをBinding緩衝液（反応に用いた溶液からEDTAを除いたもの、500 μl）で5回洗浄した。TBPビーズに結合したE1Aを、12% ポリアクリルアミドSDSゲルを用いて電気泳動した。バンドをウエスタンブロットにより検出し [一次抗体: Adenovirus-2 E1A (13S-5) rabbit polyclonal IgG; Santa Cruz Biotechnology, 二次抗体: HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) DS Grd; 2YMED] により検出し、阻害活性の評価はレーザーデンシトメーター (LKB Model 2222 Ultro-Scan XL) を用いて行なった。

亜鉛の効果調べるための、E1AとTBPビーズを用いた共沈降実験

E1A、合成化合物、Binding緩衝液（上の実験で用いたもの）、4% メタノールを含む反応液を、室温で30分間放置した。硫酸亜鉛を加え、さらに室温で5分間放置した。Nickカラム（反応に用いたBinding緩衝液で流出）によって高分子化合物を分離し、TBPビーズを加えた（全量

410 μ l)。氷上での放置、ビーズの洗浄、SDS-PAGE、バンドの定量は上の実験と同様に行なった。

Sp1のゲルシフト実験

Sp1は、大腸菌から発現させたものを用いた。二本鎖DNAオリゴヌクレオチドとしては、GC-ボックスを含む二本鎖オリゴヌクレオチド

5'-CTAGTGGGGCGGGGCCT-3'

3'-ACCCCGCCCCGGAGATC-5'

を用いた。5'-末端標識は、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (Takaraから購入) および $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Du pontから購入) を用いて行なった。ゲルシフト実験は"第一章に関する実験"に記載した方法で行なった。(ただし、ジチオトレイトールは入れない。)

参考文献

- 1) Nishibata, Y.; Itai, A. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 2921.
- 2) Uhlmann, E.; Peyman, A. *Chem. Rev.* **1990**, 90, 543.
- 3) Stubbe, J.; Kozarich, J. W. *Chem. Rev.* **1987**, 87, 1107.
- 4) Long, B. J.; Golik, J.; Forenza, S.; Ward, B.; Rehfuess, R.; Dabrowiak, J. C.; Catino, J. J.; Musial, S. T.; Brookshire, K. W.; Doyle, T. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1989**, 86, 2.
- 5) Sugiura, Y.; Uesawa, Y.; Takahashi, Y.; Kuwahara, J.; Golic, J.; Doyle, T. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1989**, 86, 7672.
- 6) Konishi, M.; Ohkuma, H.; Tsuno, T.; Oki, T.; VanDuyne, G. D.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3715.
- 7) Kopp, E.; Ghosh, S. *Science* **1994**, 265, 956.
- 8) O'Keefe, S. J.; Tamura, J.; Kincaid, R. L.; Tocci, M. J.; O'Neill, E. A. *Nature* **1992**, 357, 692.
- 9) Clipstone, N. A.; Crabtree, G. R. *Nature* **1992**, 357, 695.
- 10) Fruman, D. A.; Klee, C. B.; Bierer, B. E.; Burakoff, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1992**, 89, 3686.
- 11) Liu, J.; Albers, M. W.; Wandless, T. J.; Luan, S.; Alberg, D. G.; Belshaw, P. J.; Cohen, P.; MacIntosh, C.; Klee, C. B.; Schreiber, S. L. *Biochemistry* **1992**, 31, 3896.
- 12) Schreiber, S. L. *Cell* **1992**, 70, 365.
- 13) Berger, J.; Micanovic, R.; Greenspan, R. J.; Udenfriend, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1989**, 86, 1457.
- 14) Hsu, M.-C.; Schutt, A. D.; Holly, M.; Slice, L. W.; Sherman, M. I.; Richman, D. D.; Potash, M. J.; Volsky, D. J. *Science* **1991**, 254, 1799.
- 15) Cupelli, L. A.; Hsu M.-C. *J. Virol.* **1995**, 69, 2640.
- 16) Hsu, M.-C.; Dhingra, U.; Eurley, J. V.; Holly, M.; Keith, D.; Nalin, C. M.; Richou, A. R.; Shutt, A. D.; Tam, S. Y.; Potash, M. J.; Volsky, D. J.; Richman, D. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1993**, 90, 6395.
- 17) Braddock, M.; Cannon, P.; Muckenthaler, M.; Kingsman, A. J.; Kingsman, S. M. *J. Virol.* **1994**, 68, 25.
- 18) Barré-Sinoussi, F.; Chermann, J.-C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vézinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L. *Science* **1983**, 220, 868.
- 19) Wain-Hobson, S.; Sonigo, P.; Danos, O.; Cole, S.; Alizon, M. *Cell* **1985**, 40, 9.
本文献中ではブリュ株のLAV塩基配列とされたが後にライ株のものであることがわかった²⁰⁾。
- 20) Wain-Hobson, S.; Vartanian, J.-P.; Henry, M.; Chenciner, N.; Cheynier, R.; Delassus, S.; Martins, L. P.; Sala, M.; Nugeyre, M.-T.; Guétard, D.; Klatzmann, D.; Gluckman, J.-C.; Rozenbaum, W.; Barré-Sinoussi, F.; Montagnier, L. *Science* **1991**, 252, 961.
- 21) Rosen, C. A.; Sodroski, J. G.; Haseltine, W. A. *Cell* **1985**, 41, 813.
- 22) Sen, R.; Baltimore, D. *Cell* **1986**, 46, 705.
- 23) Lenardo, M. J.; Baltimore, D. *Cell* **1989**, 58, 227.
- 24) Baeuerle, P. A. *Biochim. Biophys. Acta.* **1991**, 1072, 63.

- 25) Grimm, S.; Baeuerle, P. A. *Biochem. J.* **1993**, 290, 297.
- 26) Garcia, J. A.; Wu, F. K.; Mitsuyasu, R.; Gaynor, R. B. *EMBO J.* **1987**, 6, 3761.
- 27) Nabel, G.; Baltimore, D. *Nature* **1987**, 326, 711.
- 28) Maekawa, T.; Sakura, H.; Sudo, T.; Ishii, S. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 14591.
- 29) Fan, C.-M.; Maniatis, T. *Genes Dev.* **1990**, 4, 29.
- 30) Baldwin, A. S., Jr.; Leclair, K. P.; Singh, H.; Sharp, P. A. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, 10, 1406.
- 31) Gaynor, R. B.; Muchardt, C.; Diep, A.; Mohandas, T. K.; Sparkes, R. S.; Lysis, A. J. *Genomics* **1991**, 9, 758.
- 32) Nomura, N.; Zhao, M.-J.; Nagase, T.; Maekawa, T.; Ishizaki, R.; Tabata, S.; Ishii, S. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 8590.
- 33) Sudo, T.; Ozawa, K.; Soeda, E.; Nomura, N.; Ishii, S. *Genomics* **1992**, 12, 167.
- 34) Nakamura, T.; Donovan, D. M.; Hamada, K.; Sax, C. M.; Norman, B.; Flanagan, J. R.; Ozato, K.; Westphal, H.; Piatigorsky, J. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, 10, 3700.
- 35) Ron, D.; Brasier, A. R.; Habener, J. F. *Mol. Cell. Biol.* **1991**, 11, 2887.
- 36) Muchardt, C.; Seeler, J.-S.; Nirula, A.; Shurland, D.-L.; Gaynor, R. B. *J. Virol.* **1992**, 66, 244.
- 37) Gaynor, R. *AIDS* **1992**, 6, 347.
- 38) Seeler, J.-S.; Muchardt, C.; Suessle, A.; Gaynor, R. B. *J. Virol.* **1994**, 68, 1002.
- 39) Vaishnar, Y. N.; Wong-Staal, F. *Annu. Rev. Biochem.*, **1991**, 60, 577.
- 40) 鈴木義昭、岩淵雅樹、藤井義明、谷口維紹、村松正実 編 "実験医学増刊 転写因子研究の新展開" 羊土社、東京、**1993**.
- 41) Freemont, P. S.; Lane, A. N.; Sanderson, M. R. *Biochem. J.* **1991**, 278, 1.
- 42) Pavletich, N. P.; Pabo, C. O. *Science* **1991**, 252, 809.
- 43) Omichinski, J. G.; Clore, G. M.; Robien, M.; Sakaguchi, K.; Appella, E.; Gronenborn, A. M. *Biochemistry* **1992**, 31, 3907.
- 44) Rice, W. G.; Schaeffer, C. A.; Harten, B.; Villinger, F.; South, T. L.; Summers, M. F.; Henderson, L. E.; Bess, J. W., Jr.; Arthur, L. O.; McDougal, J. S.; Orloff, S. L.; Mendeleyev, J.; Kun, E. *Nature* **1993**, 361, 473.
- 45) Pein, A. R., private communication.
- 46) Otsuka, S.; Yamanaka, T. *Metalloproteins*; Kodansha LTD.: Tokyo, **1988**.
- 47) Vallee, B. L.; Auld, D. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, 87, 220.
- 48) Kannan, K. K.; Nostrand, B.; Fridborg, K.; Lövgren, S.; Ohlsson, A.; Petef, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1975**, 72, 51.
- 49) Tainer, J. A.; Getzoff, E. D.; Beem, K. M.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *J. Mol. Biol.* **1982**, 160, 181.
- 50) Quijcho, F. A.; Lipscomb, W. N. *Adv. prot. Chem.* **1971**, 25, 1.
- 51) Otsuka, M.; Sugiura, Y. *Handbook in Metal-Ligand Interaction in Biological Fluids, Bioorganic Chemistry*, Vol. 2; Berthon, G., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1995**; p926.
- 52) Otsuka, M.; Satake, H.; Sugiura, Y.; Murakami, S.; Shibasaki, M.; Kobayashi, S. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 8497.
- 53) 村上 悟、修士論文、東京大学、1993年.
- 54) Kuwahara, J.; Coleman, J. E. *Biochemistry* **1990**, 29, 8627.
- 55) Summers, M. F. *J. Cell. Biochem.* **1991**, 45, 41.
- 56) Nagaoka, M.; Kuwahara, J.; Sugiura, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 194, 1515.
- 57) Fujita, T.; Nolan, G. P.; Ghosh, S.; Baltimore, D. *Genes Dev.* **1992**, 6, 775.
- 58) 泉井玲子、梅沢一夫、大塚雅巳、第68回 日本生化学大会発表抄録集、1995年、840.
- 59) Hallman, P. S.; Perrin, D. D.; Watt, A. E. *Biochem. J.* **1971**, 121, 549.
- 60) Giroux, E. L.; Henkin, R. I. *Biochim. Biophys. Acta.* **1972**, 273, 64.
- 61) Glusker, J. P. *Adv. Protein Chem.*, **1991**, 42, 1.
- 62) Tombeux, J. J.; Goeminne, A. M.; Eeckhaut, Z. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1977**, 39, 1655.
- 63) Carroll, F. I.; Dickson, H. M.; Wall, M. E. *J. Org. Chem.* **1965**, 30, 33.
- 64) Papaioannou, G. *Chem. Chron*, **1981**, 10, 243 (*Chem. Ab.* **1983**, 98, 53479t).
- 65) Burfield, D. R.; Gan, S.-N.; Smithers, R. H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 666.
- 66) Monzingo, A. F.; Matthews, B. W. *Biochemistry* **1982**, 21, 3390.
- 67) Roderick, S. L.; Fournie-Zaluski, M. C.; Roques, B. P.; Matthews, B. W. *Biochemistry* **1989**, 28, 1493.
- 68) Ondetti, M. A.; Rubin, B.; Cushman, D. W. *Science* **1977**, 196, 441.
- 69) Ondetti, M. A.; Condon, M. E.; Reid, J.; Sabo, E. F.; Cheung, H. S.; Cushman, D. W. *Biochemistry* **1979**, 18, 1427.
- 70) Roques, B. P.; Fournie-Zaluski, M. C.; Soroca, E.; Lecomte, J. M.; Malfroy, B.; Llorens, C.; Schwartz, J.-C. *Nature* **1980**, 288, 286.
- 71) Gomez-Monterrey, I.; Beaumont, A.; Nemecek, P.; Roques, B. P.; Fournie-Zaluski, M.-C. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1865.
- 72) Suh, J.; Lee, S. H.; Uh, J. Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 585.
- 73) 淀井淳司ほか "実験医学 特集/レドックス制御と細胞の生と死" **1994**, 12-13, 15.
- 74) Barry, P. A.; Pratt-Lowe, E.; Peterlin, B. M.; Luciw, P. A. *J. Virol.* **1990**, 64, 2932.
- 75) Miyamoto, S.; Maki, M.; Schmitt, M. J.; Hatanaka, M.; Verma, I. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 12740.
- 76) Böhnlein, E.; Lowenthal, J. W.; Siekevits, M.; Ballard, D. W.; Franza, B. R.; Greene, W. C. *Cell* **1988**, 53, 827.
- 77) Edbrooke, M. R.; Burt, D. W.; Cheshire, J. K.; Woo, P. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, 9, 1908.
- 78) Visvanathan, K. V.; Goodbourn, S. *EMBO J.* **1989**, 8, 1129.
- 79) Kawakami, K.; Scheidereit, C.; Roeder, R. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, 85, 4700.
- 80) Kretzschmar, M.; Meisterernst, M.; Scheidereit, C.; Li, G.; Roeder, R. G. *Genes Dev.* **1992**, 6, 761.
- 81) Bandres, J. C.; Ratner, L. *J. Virol.* **1994**, 68, 3243.
- 82) Schmid, R. M.; Perkins, N. D.; Duckett, C. S.; Anderews, P. C.; Nabel, G. J. *Nature* **1991**, 352, 733.
- 83) Arora, K.; Dai, H.; Kazuko, S. G.; Jamal, J.; O'Connor, M. B.; Letsou, A.; Warrior, R. *Cell* **1995**, 81, 781.
- 84) Grieder, N. C.; Nellen, D.; Burke, R.; Basler, K.; Affolter, M. *Cell* **1995**, 81, 791.
- 85) Rushlow, C. A.; Han, K.; Manley, J. L.; Levine, M. *Cell* **1989**, 59, 1165.

- 86) Steward, R. *Cell* **1989**, 59, 1179.
- 87) Roth, S.; Stein, D.; Nüsslein-Volhard, C. *Cell* **1989**, 59, 1189.
- 88) Zabel, U.; Schreck, R.; Baeuerle, P. A. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 252.
- 89) Liu, J.; Sodeoka, M.; Lane, W. S.; Verdine, G. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 908.
- 90) Liu, J.; Fan, Q. R.; Sodeoka, M.; Lane, W. S.; Verdine, G. L. *Chem. Biol.* **1994**, 1, 47.
- 91) Ghosh, G.; Duynne, G. V.; Ghosh, S.; Sigler, P. B. *Nature* **1995**, 373, 303.
- 92) Müller, C. W.; Rey, F. A.; Sodeoka, M.; Verdine, G. L.; Harrison, S. C. *Nature* **1995**, 373, 311.
- 93) Inoue, J.; Takahara, T.; Akizawa, T.; Hino, O. *Oncogene* **1993**, 8, 2067.
- 94) Suzuki, Y. J.; Aggarwal, B. B.; Packer, L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 189, 1709.
- 95) Suzuki, Y. J.; Packer, L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 193, 277.
- 96) Roeder, M.; Staal, F. J. T.; Rajin, P. A.; Ela, S. W.; Herzenberg, L. A.; Herzenberg, L. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 4884.
- 97) Staal, F. J. T.; Roeder, M.; Herzenberg, L. A.; Herzenberg, L. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 9943.
- 98) Meyer, M.; Schreck, R.; Müller, J. M.; Baeuerle, P. A. *Oxidative Stress, Cell Activation and Viral Infection*; Pasquier, C.; Olivier, R. Y. Auclair, C.; Packer, L., Eds.; Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland, **1994**; p217.
- 99) Biswas, D. K.; Dezubu, B. J.; Ahlers, C. M.; Pardee, A. B. *J. Acq. Immun. Def. Synd.* **1993**, 6, 778.
- 100) Biswas, D. K.; Ahlers, C. M.; Dezubu, B. J.; Pardee, A. B. *Molecular Medicine* **1994**, 31.
- 101) Higgins, K. A.; Perez, J. R.; Coleman, T. A.; Dorshkind, K.; McComas, W. A.; Sarmiento, U. M.; Rosen, C. A.; Narayanan, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 9901.
- 102) Hayashi, T.; Ueno, Y.; Okamoto, T. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 11380.
- 103) Fazely, F.; Dezube, J.; Allen-Ryan, J.; Pardee, A. B.; Ruprecht, R. M. *Blood* **1991**, 77, 1653.
- 104) Biswas, D. K.; Ahlers, C. M.; Dezube, B. J.; Pardee, A. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 11044.
- 105) Macilwain, C. *Nature* **1993**, 364, 369.
- 106) Berk, A. J. *Annu. Rev. Genet.* **1986**, 20, 45.
- 107) Flint, J.; Shenk, T. *Annu. Rev. Genet.* **1989**, 23, 141.
- 108) Berk, A. J.; Sharp, P. A. *Cell* **1978**, 14, 695.
- 109) Chatterjee, P. K.; Bruner, M.; Flint, S. J.; Harter, M. L. *EMBO J.* **1988**, 7, 835.
- 110) Bagchi, S.; Raychaudhuri, P.; Nevins, J. R. *Cell* **1990**, 62, 659.
- 111) Rice, A. P.; Mathews, M. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 4200.
- 112) Lee, W. S.; Kao, C. C.; Bryant, G. O.; Liu, X.; Berk, A. J. *Cell* **1991**, 67, 365.
- 113) Horikoshi, N.; Maguire, K.; Kralli, A.; Maldonado, E.; Reinberg, D.; Weinmann, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 5124.
- 114) Kliewer, S.; Garcia, J.; Pearson, L.; Soultanakis, E.; Dasgupta, A.; Gaynor, R. *J. Virol.* **1989**, 63, 4616.
- 115) Peterson, M. G.; Tanese, N.; Pugh, B. F.; Tjian, R. *Science* **1990**, 248, 1625.
- 116) Kao, C. C.; Lieberman, P. M.; Schmidt, M. C.; Zhou, Q.; Pei, R.; Berk, A. J. *Science* **1990**, 248, 1646.
- 117) Hoffmann, A.; Sinn, E.; Yamamoto, T.; Wang, J.; Roy, A.; Horikoshi, M.; Roeder, R. *Nature* **1990**, 346, 387.
- 118) Song, C.-Z.; Loewenstein, P. M.; Green, M. J. *J. Virol.* **1995**, 69, 2907.
- 119) Geisberg, J. V.; Lee, W. S.; Berg, A. J.; Ricciardi, R. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 2488.
- 120) Culp, J. S.; Webster, L. C.; Friedman, D. J.; Smith, C. L.; Huang, W.; Wu, F. Y.-H.; Rosenberg, M.; Ricciardi, R. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 6450.
- 121) Webster, L. C.; Ricciardi, R. P. *Mol. Cell. Biol.* **1991**, 11, 4287.
- 122) Nikov, D. B.; Hu, S.-H.; Lin, J.; Grash, A.; Hoffmann, A.; Horikoshi, M.; Chua, N.-H.; Roeder, R.; Burley, S. K. *Nature* **1992**, 360, 40.
- 123) Otsuka, M.; Fujita, M.; Sugiura, Y.; Ishii, S.; Aoki, T.; Yamamoto, T.; Inoue, J. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 4267.
- 124) Otsuka, M.; Fujita, M.; Aoki, T.; Ishii, S.; Sugiura, Y.; Yamamoto, T.; Inoue, J. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3264.
- 125) Fujita, M.; Otsuka, M.; Sugiura, Y. *J. Med. Chem.* in press.

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を賜り、また終始御指導御鞭撻を賜りました京都大学化学研究所 杉浦幸雄 教授に深く感謝の意を表します。

常に誠意のある御指導を直接に賜りました京都大学化学研究所 大塚雅巳 助教授に心より感謝致します。

種々有益な御助言を頂きました京都大学化学研究所 桑原 淳 博士（現徳島大学助教授）、森井 孝 博士に感謝致します。また種々御討議頂くとともに、研究生活を有意義なものとして下さいました京都大学化学研究所生体反応設計II部門の方々に感謝致します。

阻害活性試験に関して御指導頂くとともに転写因子などを御提供下さいました東京大学医科学研究所 井上純一郎 助教授、理研ライフサイエンスつくば研究センター 石井俊輔 博士に感謝致します。生化学実験を直接御指導頂きました理研ライフサイエンスつくば研究センター 前川利男 博士、東京大学医科学研究所 青木 努 修士に感謝致します。

原子発光スペクトル測定を御指導頂きました京都大学化学研究所 松井正和 教授、宗林由樹 博士に感謝致します。FAB高分解能質量分析を行なって下さいました日本電子株式会社 田中 一夫 氏、各種スペクトルの測定を行なって下さいました京都大学化学研究所 岡村恵美子 博士、大嶺恭子 氏、寺田知子 氏に感謝致します。また、本研究の一部は日本学術振興会より援助を受けたものであり、感謝致します。

社会人から学生に戻っての研究生活が実りの多いものであったことに感謝を捧げます。3年間の日々を支えて下さった多くの方々に感謝致します。